

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

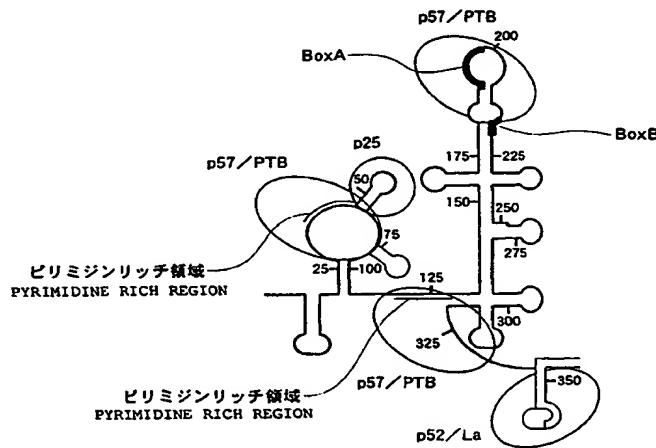
世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/09, 15/67, C12Q 1/68, A61K 48/00	A1	(11) 国際公開番号 WO00/12691 (43) 国際公開日 2000年3月9日(09.03.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/03682 (22) 国際出願日 1999年7月8日(08.07.99) (30) 優先権データ 特願平10/241367 1998年8月27日(27.08.98) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 山田 修(YAMADA, Osamu)[JP/JP] 〒654-0113 兵庫県神戸市須磨区緑が丘2-11-30 Hyogo, (JP) 吉田 洋(YOSHIDA, Hiroshi)[JP/JP] 〒593-8322 大阪府堺市津久野町3-20-15 Osaka, (JP) 張 菲(ZHANG, Jing)[CN/JP] 〒554-0002 大阪府大阪市此花区伝法1-1-1-408 Osaka, (JP)	JP	(74) 代理人 角田嘉宏, 外(SUMIDA, Yoshihiro et al.) 〒650-0031 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階 有古特許事務所 Hyogo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: NUCLEIC ACID SEQUENCE FOR POTENTIATING THE EXPRESSION OF USEFUL GENE AND METHOD THEREFOR

(54) 発明の名称 有用遺伝子発現増強核酸配列および方法



(57) Abstract

A nucleic acid sequence for potentiating the expression of a useful gene which contains a sequence carried by the 5'-nontranslational region, its fragment or its variant and is capable of potentiating the expression of a gene to thereby elevate the yield of the gene product; a vector containing the above nucleic acid sequence; host cells transformed or transfected by the above vector; a process for producing a useful gene product by using the vector; and a method for potentiating the expression of a useful gene by using the vector. Moreover, the above-mentioned sequence is useful in screening an initiation factor of interaction with IRES or IRES-dependency, treating diseases caused by the cap-dependent mRNA translation or a decrease in the IRES activity, or in diagnosing the severity of hepatitis C.

ウイルス遺伝子の5' 非翻訳領域もしくはその断片またはその変異体が有する配列を含む、遺伝子の発現を増強して遺伝子産物の生産量を増加させることができる有用遺伝子発現増強核酸配列、当該核酸配列を含むベクター、当該ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞、ならびに当該ベクターを用いた有用遺伝子産物の製造方法、および有用遺伝子の発現を当該ベクターを用いて増強させる方法を提供する。さらに、IRESとの相互作用性やIRES依存性の翻訳開始因子のスクリーニング、キャップ依存的mRNA翻訳またはIRES活性の低下に起因する疾患の治療やC型肝炎の重症度の診断にもこの配列を利用することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スードン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	セエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スウェーデン
BF	ブルガリア・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴー
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダンド・トバゴ
CG	コンゴー	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	モラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴィエトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴースラビア
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明細書

有用遺伝子発現増強核酸配列および方法

5

〔技術分野〕

本発明は、遺伝子発現用のベクターにおいて、有用遺伝子の発現を増強することができる有用遺伝子発現増強核酸配列、当該有用遺伝子発現増強核酸配列を含むベクター、当該ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞、ならびに当該ベクターを用いた有用遺伝子産物の製造方法、および有用遺伝子の発現を当該ベクターを用いて増強させる方法に関する。さらに詳細には、in vivoおよびin vitroでの遺伝子産物の生産量を増加させることができ、従って種々の実験用途の他に、臓器や腫瘍などに特異的であるがその活性が弱いために実用化が難しかったプロモーターと組み合わせることによって効果的な遺伝子治療にも応用することができる、有用遺伝子発現増強核酸配列に関する。また、この有用遺伝子発現増強核酸配列は、IRESとの相互作用性物質や翻訳開始因子のスクリーニングのほか、種々の疾患の治療、予防や診断にも利用される。

10

〔背景技術〕

mRNAの翻訳開始機構には、キャップ依存的機構とキャップ非依存的機構が存在することが知られている。原核細胞系mRNAの5'末端構造はpppNであるが、真核細胞のmRNAは5'末端にキャップ構造 ((7-MeG)-5'-ppp-5'--(G/A)-3'-p-) (G、Aのリボース部分はメチル化されることもある) を有している。このキャップ構造は核から細胞質へのmRNAの輸送過程に寄

与し、mRNAをRNaseから保護する役割を有している。真核細胞の細胞質では、キャップ結合蛋白質複合体eIF4F(Eukaryotic initiation factor : eIF)のキャップ構造への結合により、リボソームの40SサブユニットのmRNA 5'末端へのエントリーが促進され、mRNAの5'末端にエントリーしたリボソームは、100塩基前後と短い5'非翻訳領域をスキャンニングして、mRNA上を3'方向に移動し、多くの場合、最初に出会うAUG配列を開始コドンとしてペプチド合成が行われる。

しかしながら、以上のようなキャップ依存的翻訳開始機構とは異なる真核細胞系mRNAの存在が確認された。真核細胞系mRNAの5'末端にキャップ構造の存在が明らかにされていたが、ポリオウイルス (poliovirus) mRNAの5'末端はキャップ構造ではなく、単なるpUであることが報告された (Nomoto, A. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5345, 1977)。その後、ポリオウイルスRNAの全一次構造が解明され、詳細な遺伝子地図も明らかとなった (Kitamura, N. et al. ; Nature, 291, 547, 1981)。その結果、開始コドンAUGはmRNAの743番目の塩基に位置しており、その上流に多くのAUG配列が存在していることが判明した。この様なmRNAの構造は、ポリオウイルスの仲間のウイルス (ピコルナウイルス科のウイルス) に共通であることも明らかにされた。さらに、ポリオウイルス (Pelletier, J. et al. ; Nature, 334, 320, 1988) と脳心筋炎ウイルス (encephalomyocarditis virus ; EMCV) (Jang, S. K. et al. ; J. Virol., 62, 2636, 1988) のRNAを使用した実験により、キャップ非依存的翻訳開始機構 (内部開始モード) の存在が証明され、リボソームはmRNAの5'非翻訳領域 (5'-untranslated region ; 5'-UTR) 内に存在する塩基配列を認識し、エントリーすることが判明した。リボソームのエントリーオーに必要な領域は、IRES (internal ribosomal entry site (内部リボソームエントリー部位)) と言われている。

ビコルナウイルスRNAの5'-非翻訳領域は約600～1200塩基であり、この領域の中の約450塩基がIRES活性を有している。これらビコルナウイルスIRES中には共通構造が存在し、ピリミジンリッチ領域 ((C/U)_x) とそれに続くAUGを含む約7塩基の配列がある。両者の間には10～20塩基のランダムな塩基配列 (Ny) が介在している (Jang, S. K. et al.; in Translationally Regulated Genes in Higher Eukaryotes, Thach, R. E. ed., 292-309, Karger, 1990)。ピリミジンリッチ領域とは、ピリミジン塩基が連続して少なくとも4～5以上存在している領域をいう。かかる (C/U)_x-Ny-AUGのユニットがIRESにとって必要な構造の一つであることが考えられ、実際にAUGを含む塩基配列を欠損させるとIRES活性は低下し、さらに(C/U)_x全域の欠損によりIRES活性が消失することが知られている (Kuge, S. et al.; J. Virol., 61, 1478, 1987, Iizuka, N. et al.; J. Virol., 65, 4867, 1991)。一般に、(C/U)_xの配列の領域をBoxA、AUGを含む約7塩基の配列の領域をBoxBと言う。両Boxは、18SリボソームRNA (rRNA) の3'末端と相補性を示すため、IRESは原核生物系mRNAのシヤイン・ダルガーノ配列 (SD配列) と類似した機能を有するものであると考えられる (Pilipenko, E. V. et al.; Cell, 68, 119, 1992)。

ビコルナウイルスIRESは、その構造上の特徴により2つの型に分類されており、エンテロウイルス (enterovirus) とラノウイルスのIRESを1型、カルジオウイルス (cardiovirus) とアフトウイルス (aphthovirus) のIRESを2型と分類している。また、ヘパトウイルス (hepatovirus) のIRESは2型に類似していると考えられている。

1型IRESの場合、リボソームは(C/U)_x-Ny-AUGユニット下流をスキヤニングし、最初に出会うAUGを開始コドンとしてペプチド合成を開始する。実際に、開始コドンAUGの前にAUG配列を挿入すると、ウイルス複製は著しく阻害される (Kuge, S. et al.; J. Virol., 63, 1069, 1989, K

uge, S. et al. ; J. Mol. Biol., 207, 175, 1989)。2型のIERSの場合には、(C/U)x-Ny-AUGユニット内のAUGが開始コドンとして使われている。

1989年、輸血後非A非B型肝炎の病原体として、プラス一本鎖RNAウイルスであるC型肝炎ウイルス（以下HCV）が報告された（Choo, Q. et al. ; Science, 244, 359, 1989）。臨床においては慢性感染を経て高率に発生する肝硬変・肝細胞癌（Saito, I. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6547, 1990）が問題となっている。現在までに、少なくとも40株のHCVゲノムの全塩基配列が決定された。全長約9600塩基のゲノムRNAは、341塩基前後の5' 非翻訳領域、3008～3037アミノ酸残基のポリペプチドをコードする翻訳領域、200～300塩基の3' 非翻訳領域より成り、3' 非翻訳領域はポリU/C配列の後、98塩基の3' Xと呼ばれる構造で終わる。ポリペプチドはラビウイルスもしくはペストウイルスに類似しており（Kato, N. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 9524, 1990、Takamizawa, A. et al. ; J. Virol., 65, 1105, 1991）ウイルス蛋白質にはN末からC/core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5Aと名付けられている。E2に相当する領域は、ラビウイルス属では非構造蛋白質NS1、ペストウイルス属ではエンベロープ蛋白質E2である。HCVはかつてE2/NS1と呼ばれたが、ペストウイルス属に近い性質を示し、エンベロープ蛋白質であると予想されるようになったため、最近では単にE2と言う。塩基配列の相同性からウイルスの遺伝子型には少なくとも6個、最大で11個の遺伝子型が存在することが報告されている。

ウイルス分類学上、HCVは後に同定されたGBウイルス／G型肝炎ウイルスとともにラビウイルス科の独立した一属に分類される。HCVの塩基配列中、5' 末端非翻訳領域には、通常真核細胞が行っているmRNAからのキヤップ依存性の蛋白質への翻訳とは異なった、ピコナウイルスなどに認

められる内部翻訳開始領域IRESが存在することが発見されている (Tsukiyama-Kohara, K. et al. ; J. Virol., 66, 1476, 1992)。このIRESはビコルナウイルスIRESより短い塩基配列で活性を示し、両者全く異なる二次構造が予想されている (Tsukiyama-Kohara, K. et al. ; J. Virol., 66, 1476, 1992, Brown, E. A. et al. ; Nucl. Acid Res., 20, 5041, 1992)。一方このHCVのIRES領域にも、18S rRNAの3'末端に相補的なBoxAおよびBoxBに相当する塩基配列が観察されている (Nomoto, A. et al. ; in Viral Hepatitis and Liver Disease, Nishioka, K., Suzuki, H., Mishiri, S., Oda, T. eds., 118, Springer-Verlag, 1994)。HCVのIRES領域の推定構造については、図1を参照されたい。図中、前記BoxAに相当するピリミジンリッチ領域および前記BoxBに相当する、AUGを含む約7塩基の配列を太線で示し、BoxAの上流に存在するピリミジンリッチ領域を二重線で示し、トランス因子（後述）の結合部位に囲みを付した。

しかしながら、最近、IRES活性が同定されたペストウイルス (pestivirus、フラビウイルス科) のIRESには、二次構造こそHCVのIRESに似ているものの (Brown, E. A. et al. ; Nucl. Acid Res., 20, 5041, 1992)、BoxAおよびBoxBに相当する塩基配列は存在しない。最近次々に発見されている植物ウイルスのIRESは、さらに短い塩基配列で活性を示し、BoxAやBoxBに相当する塩基配列は保持されていない。これらの結果から、両BoxはIRES活性にとって必ずしも必須でないことが示される。IRESの機能発現様式は様々であり、キャップ依存的翻訳開始機構のような画一的な機構では説明しきれない可能性がある。

HCVでは、翻訳の開始は5'部位に存在するIRESに依存する点で、通常の真核細胞mRNAに見られるキャップ依存性の蛋白質合成における翻訳開始と異なっている。IRES依存性に合成される一本の長いポリペプチドは、

5

宿主シグナルペプチダーゼと2種のウイルスプロテアーゼによるプロセシングを受けて上述の個々の蛋白質となる。これらの蛋白質はシグナルペプチダーゼによるプロセシング、糖鎖の付加、ウイルス蛋白質によるリン酸化など、さらに個別にプロセシングを受けてウイルス複製や感染成立に必要な様々な機能を獲得して行く。

10

HCVの約341塩基と長い5' 非翻訳領域は、開始コドンとならないAUG配列を複数（2～5個）持ち、複雑な二次構造を形成し得る点でフラビウイルス属よりはベストウイルス属もしくはピコナウイルス科のウイルスに類似している (Han, J. H. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1711, 1991, Brown, E. A. et al. ; Nucleic Acid. Res., 20, 5041, 1992)。

15

現在までに様々な研究者によってHCVのIRES領域についての報告がなされているが、その内容は研究者によって差異が認められる。これは、実験で用いられたRNAの構造や、翻訳系が影響したためであると考えられる。ウサギ網状赤血球抽出液、もしくはワクシニアウイルスによりT7 RNAポリメラーゼを共発現させる培養細胞へのDNAトランスフェクションにより、5' 非翻訳領域の40塩基前後から翻訳領域の30塩基前後までをIRES領域とする考え方がある (Reynolds, J. E. et al. ; EMBO J., 14, 6010, 1995)。また、培養細胞に対してRNAトランスフェクションを行い、5' 境界は28塩基から45塩基の間にあることも証明されている (Kamoshita, N. et al. ; Virology, 233, 10, 1997)。さらに、無細胞系での解析によると、3' 境界は翻訳領域の数十塩基ではなく、370塩基から516塩基の間にあるという結果も得られている。これはコア蛋白質（5' 非翻訳領域直下の翻訳領域の配列によりコードされる蛋白質）のN末端側3分の2がIRES活性を上昇させる報告 (Lu, H. -H. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1412, 1996) を支持する結果であるが、この領域がRNAの

構造として重要である可能性も否定できない。

IRESの機能発現には、キャップ依存的翻訳開始に関わる分子群の多くが動員されるが、その他の宿主細胞側分子群（トランス因子）も必要であるとされる (Schepers, G. C. et al. ; J. Biol. Chem., 267, 7269, 1992)。このことは、IRES機能発現が種および組織・細胞特異的であることからも容易に想像できる。

キャップ構造を持つmRNAの無細胞蛋白質合成系として知られる麦芽抽出液、ウサギ網状赤血球の抽出液 (RRL)、およびHeLa細胞抽出液を使用した各ウイルスIRES活性の比較実験によれば、麦芽抽出液では、ビコルナウイルスIRESは報告された限り活性を示さない。一方、RRL中ではEMCVのIRESは高い活性を示すが、ポリオウイルスIRESの活性は微弱であり、HeLa細胞抽出液を加えることによりRRLでのポリオウイルスIRESの活性は回復することが報告されている (Brown, B. A. et al. ; Virology, 97, 396, 1979、Dorner, A. J. et al. ; J. Virol., 50, 507, 1984)。

また、HeLa細胞抽出液中ではこれらウイルスのIRESはいずれも高い活性を示し、A型肝炎ウイルス (HAV) のIRES活性のみがHeLa細胞抽出液中でも低いという結果も得られている (Glass, M. J. et al. ; Virology, 193, 1047, 1993)。これらのことから、キャップ構造をもつmRNAが利用する、開始因子以外の宿主細胞分子群がIERSの機能発現には必要であることは明らかである。また、IRES毎にその機能発現に要求される分子群には質的・量的な違いがあることも明らかである。

さらに、いずれのIRESへも多くの宿主細胞側分子が結合することが、UVクロスリンクング法 (UV照射により、核酸とそれに結合している蛋白質を共有結合させ、結合蛋白質を検出する方法) による解析によって示されている。そして翻訳の開始には、RNAの高次構造の他に、IRES特異的に作用するトランス因子が重要な役割を果たしていることが明らかにな

つてきている。すなわち、ピコルナウイルスIRESの活性を促進する宿主分子としては、現在までのところ、2種類のIERS結合蛋白質であるLa (5 2kDa) 、PTB (polypyrimidine tract binding protein、57kDa) が知ら
れています (Meerovitch, K. et al. ; J. Virol., 67, 3798, 1993, Hell
en, C. V. T. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7642, 1993
、Borman, A. et al. ; J. Gen. Virol. 74, 1775, 1993) 。Laは自己免
疫疾患の抗原蛋白質として知られており、また、RNAポリメラーゼIIIに
による転写の終結因子である。そしてPTBは、RNAスプライシング因子のコ
ファクターである。これらは核に局在している蛋白質であり、実際に核
10 内の反応に関与している。しかしながら、例えば、ボリオウイルスの感
染により、Laは核から細胞質へと移行することが報告されており (Meer
ovitch, K. et al. ; J. Virol., 67, 3798, 1993) 、これらが細胞質で
の反応である翻訳の開始に関与しているという報告もある。

各種IRESに対する、PTBおよびLa要求性が種々検討されており、現在の
15 ところピコルナウイルスIRESのPTB要求性は強いが、HCV IRESではPTB要
求性が非常に弱いことを示唆する結果 (Kaminski, A. et al. ; RNA, 1
, 924, 1995) 、およびHCVのLaの要求量はボリオウイルスほど多くない
という結果も得られている。これとは異なり、HCVについてPTBは3箇所で
結合し、IRES機能に必要であり (Ali, N. et al. ; J. Virol., 69, 636
20 7, 1995) 、Laは開始AUGを含むRNA構造を認識して活性化する (Ali, N.
et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 2249, 1997) という報告
もある。この種の実験は、PTBを極力除いた無細胞蛋白質合成系を使用し
て行われており、PTB除去には特異的抗体やPTBに結合性を持つRNA断片が
使用されている。従って、PTBが他の分子と複合体を形成している場合に
25 は (Toyoda, H. et al. ; Arch. Virol., 138, 1, 1994) 、複合体その
ものが除かれている可能性がある。さらに、PTBの多くはリボソームに結

合していることが知られているので、リボソームまで除去されている可能性も考慮しなければならない。ゆえに、IRESのトランス因子要求性に関するさらなる研究が必要であるが、IRESが必要とするトランス因子はIRES毎に異なり、機能発現に至る機構もIRESによって様々である事が予想される。新しいIRES関連因子がHCVに存在する可能性はあり、実際に、p25という5'非翻訳領域中の2次構造を認識し、結合性が翻訳活性との相関を示すHeLa細胞中の蛋白質が報告されている (Fukushi, S. et al. ; J. Virol., 71, 1662, 1997)。

これまでに、遺伝子操作技術を用いて様々な蛋白質またはペプチド類が产生されている。例えばインスリン、各種インターフェロン、エリスロポエチン、マンナン結合蛋白質、コングルチニン、ニューロシン等、多くの物質が大腸菌をはじめとする微生物細胞およびCHO細胞等の動物細胞で产生されている。

動物由来の有用遺伝子産物を遺伝子工学的に製造する場合、大腸菌、枯草菌、酵母等の微生物細胞宿主を用いると遺伝子が発現しなかつたり、遺伝子産物である蛋白質が正しい立体構造をとらない、翻訳後修飾が正しくされない等の理由で活性を持たなかつたりすることがしばしば起こる。その問題の解決のために動物細胞が宿主として用いられることが多い。動物細胞を用いると微生物細胞に比べて上記のようなメリットが得られる可能性があるものの、培養操作が煩雑になり、また逆に遺伝子の発現量が少なくなる可能性もある。

このような細胞において遺伝子発現を行うためのベクターの開発は、多くの分子生物学的研究の基礎となる重要な課題である。かかるベクターには、目的に応じて効率的な大量発現や誘導可能な一過性発現等を行えることが要求される。その様な要求を満たすための、これらの発現系における従来の発現ベクター構築概念はプロモーターやエンハンサーの

生来の機能に依存するものであった。すなわち、目的とする遺伝子産物の生産効率を上げる手段としては、天然の遺伝子から強力なプロモーターまたはエンハンサーを選択し、目的の蛋白質やペプチド類をコードするDNA配列に連結することによりmRNAの転写効率を上昇させることができるものがあつた。大量発現を効率的に行わせる場合には、SV40(Simian Virus 40)、SR α 、サイトメガロウイルスプロモーター、アクチンプロモーター、ウイルス性LTR(Long Terminal Repeat)、例えばHTLV-1 LTR、HIV-LTR、ラウス肉芽種ウイルスLTR、単純ヘルペスチロシンキナーゼウイルスプロモーター等のプロモーターが強力なプロモーターとして知られており、これらを組み込んだ発現ベクターを主に哺乳動物細胞に対して使用することが行われている。また、エンハンサー配列をベクターに組み込むことにより遺伝子の転写効率を上昇させ、目的とする遺伝子産物の生産効率を上昇させることも行われている。

一方、遺伝子産物を一過性に発現させる場合には、発現誘導物質を使用することが行われており、例えばマウス乳頭ガンウイルス (MMTV : Mouse Mammalian Tumour Virus) プロモーターを用いた発現系で、発現が望まれる際に発現誘導物質であるデキサメタゾンを添加する方法等も行われている。

また、2種類の異なった蛋白質をコードしているcDNA(第1シストロンと第2シストロン)からの蛋白質発現を第1シストロンと第2シストロンの間にこの内部翻訳開始シグナルに相当する塩基配列を組み込むことにより、1個のプロモーターによって2種類の蛋白質を発現させることができることが報告されており (Urabe, M. et al. ; Gene, 200, 157, 1997)、また実際に応用されている。しかし、これら従来の手法によって得られる発現ベクターからは必ずしも十分な生産効率が達成されるわけではない。

5

また、近年目覚ましく開発が進められてきている遺伝子治療法によつて、従来の方法では困難であった疾病の治癒が可能となり、この方法の広範なる適用が期待されているが、体内の特定部位において目的遺伝子を望ましい効率で発現させるためのベクター構築には、依然解決されるべき問題が残されている。すなわち、プロモーターが臓器や腫瘍などに特異的であっても、その活性が弱いために遺伝子発現の効率が低く、このようなプロモーターを組み込んだベクターを用いて遺伝子を導入したとしても治療効果が存分に得られない場合がある。

10 このように、当該技術分野において、より発現効率の優れた発現ベクターの開発が望まれている。従って、本発明は、目的とする遺伝子産物の生産効率を上げるために、従来の発現ベクター構築概念にとらわれない新規な発現ベクターを提供することを目的とする。

[発明の開示]

15 本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討を行った結果、ウイルス遺伝子の5'非翻訳領域もしくはその断片またはその変異体が有する核酸配列を遺伝子発現ベクターに組み込むことによって、目的の有用遺伝子の発現が増強されることを見出し、本発明を完成した。

20 本明細書中に言う「有用遺伝子発現増強配列」とは、あらゆるウイルス遺伝子の5'非翻訳領域もしくは5'非翻訳領域及び該非翻訳領域に隣接する翻訳領域の一部を含む領域、もしくはそれらの断片またはそれらの変異体が有する核酸配列を含む配列を指す。

25 また、本明細書中に言う「有用遺伝子の発現を増強」するとは、発現を増強させる作用原因・翻訳過程・発現環境・発現方法等にこだわることなく、結果的に有用遺伝子発現を増強することである。

さらに本発明の有用遺伝子発現強核酸配列に含まれ得る、5'非翻訳領

域に隣接する翻訳領域の一部とは、5' 非翻訳領域の 5 倍数以下の塩基、好ましくは5' 非翻訳領域と同数もしくは±100 塩基程度の断片を称する。

前記有用遺伝子発現増強核酸配列における5' 非翻訳領域は、少なくとも 1 つのピリミジンリッチ領域を含むことが好ましく、また、BoxA、BoxB、トランス因子結合部位およびこれらの組合せよりなる群から選択される領域に該当する配列や、AUGまたはATGの配列をさらに含むことがより好ましい。尚、これらの領域および配列が、変異や断片化をうけることなく有用遺伝子発現増強核酸配列に含まれていることが特に好ましい。かかるAUGまたはATG配列およびBoxBに含まれるAUGまたはATG配列は、開始コドンとして有用遺伝子発現増強核酸配列の最下流または翻訳領域の最上流等に組み込まれてもよい。

また、前記有用遺伝子発現増強核酸配列における5' 非翻訳領域は、ウイルスのmRNAのIRES領域の一部または全体を含むことが好ましい。該IRES領域は、IRES活性を有していても有していないてもよいが、その由来となった領域がIRES活性を有していたものであることが好ましい。

そして、前記有用遺伝子発現増強核酸配列に含まれる5' 非翻訳領域にピリミジンリッチ領域、BoxA、BoxB、および／またはトランス因子結合部位に該当する配列が存在する場合、そのうち少なくとも 1 箇所の配列の内部または近傍（高度保存領域以外の領域）に、野生型ウイルス由來の配列の 1 個または数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入および／または付加された変異配列を含むものも本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列として好ましい。また、有用遺伝子発現増強核酸配列に5' 非翻訳領域の可変領域に該当する配列が含まれる場合、その配列内に野生型ウイルス由來の配列の 1 個または数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入および／または付加された変異配列を含んでいることが好ましい。これらの変異が、直接的あるいは間接的にIRES活性を増強することができるも

のが好ましい。

上記5' 非翻訳領域もしくはその断片の変異体を含む有用遺伝子発現増強核酸配列は、ウイルス遺伝子の5' 非翻訳領域の高度保存領域以外の領域において、置換、挿入および／または欠失を含む変異により得られるものが好ましい。特に、有用遺伝子発現増強核酸配列にIRES領域が含まれる場合、ピリミジンリッチ領域、特にBoxA、および／またはBoxBが保存された変異体が好適に利用され得る。変異の導入はPCRを用いた突然変異導入法などによって行なわれる。

前記有用遺伝子発現増強核酸配列が遺伝子発現ベクターに組み込まれる位置は、有用遺伝子が発現され得るように構築された発現ベクター内に、有用遺伝子発現増強核酸配列を組み込むことにより、直接的あるいは間接的に有用遺伝子発現を増強させることができる位置であれば特に限定されないが、発現制御プロモーター配列の下流、且つ有用遺伝子の配列の上流であることが好ましい。また、有用遺伝子発現増強核酸配列は、発現ベクターに正方向すなわち、5' から3' 方向へと転写、翻訳が行われるように組み込まれるべきである。

遺伝子発現ベクターに組み込まれる前記有用遺伝子発現増強核酸配列は、好ましくはcDNA配列である。そして、前記遺伝子発現ベクターは、好ましくは真核細胞における発現用のベクターである。

前記ウイルスとしては、RNAウイルス、例えばピコルナウイルス、HCVウイルスが好ましい。

なお、HCVのmRNAの5' 非翻訳領域の場合、BoxAは配列番号：1 のヌクレオチド第191～199位に、BoxAの上流に存在するピリミジンリッチ領域は配列番号：1 のヌクレオチド第40～46位および第120～130位に、そしてBoxBは配列番号：1 のヌクレオチド第213～219位に認められ（図1参照、図中トランス因子結合部位に囲みを付している）、また、可変領域は

配列番号：1のヌクレオチド第1～36位および第175～270位に、高度保存領域は配列番号：1のヌクレオチド第121～174位および271～339位に認められる。

遺伝子発現ベクターに組み入れられる前記有用遺伝子発現増強核酸配列に含まれる、HCV由来5'非翻訳領域または、5'末端側領域（5'非翻訳領域及び該非翻訳領域に隣接する翻訳領域の一部）の核酸配列の断片の例として、配列番号：1のヌクレオチド第1～180位、第181～341位、第1～341位、第181～713位もしくは第1～713位からなる核酸配列が現在のところ好ましいことが明らかになっている。このうち、配列番号：1のヌクレオチド第181～341位の断片で特に強力な有用遺伝子発現増強活性が認められることが判明した（実施例5および6）。

加えて、遺伝子発現ベクターに組み入れられる前記有用遺伝子発現増強核酸配列は、配列番号：7のヌクレオチド第1～342位で示される核酸配列、あるいは該配列のヌクレオチド第119位をアデニンで置換した核酸配列が含まれることが特に好ましいことが明らかになっている。

ウイルスがHCVである場合、有用遺伝子発現増強核酸配列に含まれる、HCV由来5'非翻訳領域または5'末端側領域の核酸配列の変異体として、上記の好ましい変異の中でも特に、配列番号：1の一部または全てを含む核酸配列のうち、第207位あるいはその近傍に1つまたは数個のヌクレオチドが挿入された配列、さらに好ましくは該位置に1つのチミジンが挿入された配列が好ましい。

また、HCV由来の核酸配列が用いられる場合、5'非翻訳領域に隣接する翻訳領域はコア蛋白質であり、これをコードする領域の5'側300塩基程度が有用遺伝子発現増強核酸配列に含まれ得る。ゆえに、前記有用遺伝子発現増強核酸配列が、HCVウイルスのコア蛋白質翻訳領域の一部をさらに含むものも、本発明において好適である。そして、かかる核酸配列の変

異体も、可変領域（高度保存領域以外の領域）において、置換、挿入および／または欠失を含む変異により得られるものが好ましい。

さらに本発明は、配列番号：7で示されるヌクレオチド配列からなる単離されたポリヌクレオチドと、この核酸配列が有するIRES活性と同等のIRES活性を有し当該配列の断片または変異体からなるポリヌクレオチド（すなわち、配列番号：1のヌクレオチド第1～341位に示されるHCV由来の核酸配列において、少なくとも第206位と207位との間に塩基が1つ挿入されたもの、またはその変異体もしくは断片）とを企図する。これらのポリヌクレオチドは、従来知られているHCV由来のIRES配列に比較して格段に優れたIRES活性を保有している。従って、このポリヌクレオチドを用いて、従来の宿主細胞発現を利用したポリペプチドの製造や、遺伝子治療用ベクターに組み入れて、翻訳開始をさらに効率よく行うことが可能となる。また、このポリヌクレオチド自体がこれまでに知られたよりも強いIRES活性を有しているので、発現増強はもとより、例えば生体内でIRES活性部位で変異等が生じ、IRES活性が低下したことに起因する疾患を治療するために利用することができる。

以下、5'-UTR341と特記している場合には配列番号：1およびその断片等を含む配列を指し、5'-UTR342と特記している場合には本発明によって得られたHCVの変異体由来の配列（配列番号：7）を指すこととする。

尚、前記有用遺伝子発現増強核酸配列は、翻訳増強活性を有することにより有用遺伝子の発現を増強するもの（例えば、5'-UTR341）、そして、IRES活性を増強することにより有用遺伝子の発現を増強するもの（例えば、5'-UTR342）が好ましい。

本発明はまた、如上の有用遺伝子発現増強核酸配列を含む遺伝子発現用ベクター、当該ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞、当該ベクターを用いて有用遺伝子産物を発現・製造する方法、

および当該ベクターを用いて有用遺伝子の発現を増強する方法を企図する。

本発明のさらなる特徴において、配列番号：7で示されるヌクレオチド配列からなる単離されたポリヌクレオチドあるいは、この核酸配列が有するIRES活性と同等のIRES活性を有し当該配列の断片または変異体からなるポリヌクレオチド（すなわち、HCV 5'-UTR341（配列番号：1のヌクレオチド第1～341位）に示されるヌクレオチド配列の、少なくとも第206位と207位との間に塩基が1つ挿入されたもの、またはその断片もしくは変異体）を含む、IRESとの相互作用性を有する物質をスクリーニングするためのプローブが提供される。このプローブは好ましくはラベルされており、それが有するIRESとの相互作用性を利用して目的の物質を同定する。本明細書中に言うIRESとの相互作用を有する物質とは、IRESの活性を直接的あるいは間接的に（例えば他の因子と複合体等を形成して）変化させることができる物質および単にIRESと結合する物質をいい、それらには、IRES結合タンパク質、ビリミジン領域結合タンパク質、トランス因子および翻訳開始因子等が含まれる。従って、かかる相互作用性物質はIRESの阻害、増強等を惹起するモジュレーターであることが予測される。本プローブは、固体支持体に固定化されて用いられても、液相で用いられてもよい。

さらに本発明は、配列番号：7で示されるヌクレオチド配列からなる単離されたポリヌクレオチドあるいは、この核酸配列が有するIRES活性と同等のIRES活性を有し当該配列の断片または変異体からなるポリヌクレオチド（すなわち、HCV 5'-UTR341（配列番号：1のヌクレオチド第1～341位）に示されるヌクレオチド配列の、少なくとも第206位と207位との間に塩基が1つ挿入されたもの、またはその断片もしくは変異体）を含む、IRES依存性の翻訳開始因子をスクリーニングするためのプローブ

を提供する。このフロープもやはり、好ましくはラベルされており、IR ES依存性の翻訳開始因子との会合、翻訳開始への影響を同定することによって目的の因子を同定するためのものである。

これまでに、c-myc (Nanbru C. et al. ; J. Biol. Chem., 272(51), 3 5 2061-32066, 1998, Stoneley, M. et al. ; Oncogene, 16(3), 423-428 , 1998) 、BiP (免疫グロブリン重鎖結合タンパク質、Le S. Y. et al. ; Nucleic Acids Res., 25(2), 362-369, 1997, Yang Q. et al. ; Nucleic Acids Res., 25(14), 2800-2807, 1997) 、FGF-2 (Le S. Y. et al. ; Nucleic Acids Res., 25(2), 362-369, 1997) 、PDGF 2 (Bernstein J 10 . et al. ; J. Biol. Chem., 271(14), 9356-9362, 1997) 、eIF4G (Gan W. et al. ; J. Biol. Chem., 273(9), 5006-5012, 1998) 、カリウムチャ ンネル等が、真核細胞でIRES依存的mRNA翻訳開始機構を利用しているこ とが判明している。

また、本発明の実施例に示すように、新規5' -UTR342配列は、ウイルス の複製が活発なC型肝炎患者血清より単離されたものであるので、5' -UTR341との配列上の違いを認識することにより、C型肝炎の重症度を診断 することができる。すなわち、本発明は、C型肝炎の重症度診断方法であつて、配列番号：7で示されるヌクレオチド配列からなる単離された ポリヌクレオチドあるいは、この核酸配列が有するIRES活性と同等のIR 20 ES活性を有し当該配列の断片または変異体からなるポリヌクレオチド（ すなわち、HCV 5' -UTR341（配列番号：1のヌクレオチド第1～341位）に 示されるヌクレオチド配列の、少なくとも第206位と207位との間に塩基 が1つ挿入されたもの、またはその断片もしくは変異体）を標的として 、被験者由来の生体試料中に含まれる当該ポリヌクレオチド配列の存在 25 を検出し、この配列の存在に基づいてC型肝炎の重症度を診断すること を特徴とする方法を企図する。

最後に本発明は、生体内でのキャップ依存的mRNA翻訳の低下に起因する疾患あるいはIRES活性の低下に起因する疾患を治療するために、前記有用遺伝子発現増強核酸配列核酸配列を生体内に導入することによってmRNA翻訳を促進することができるよう、当該有用遺伝子発現増強核酸配列を含むこと特徴とする治療用組成物を提供する。これらの配列を導入して損なわれていたmRNA翻訳機構を補うことによって、疾患の治療、あるいは予防も行うことができる。

すなわち本発明者らは、ベクター内のプロモーター配列とルシフェラーゼ蛋白質をコードしているcDNA配列との間に有用遺伝子発現増強核酸配列を組み込んで発現させることにより、かような核酸配列を組み込まない従来型のベクターを発現させた場合よりもルシフェラーゼの酵素活性が増大していることを見いだした。これは酵素蛋白質量の増加によるものと考えられることから、組み込んだ配列は有用遺伝子の発現増強効果を呈することが判明した。

さらに、この効果は別のプロモーターや、起源の違うルシフェラーゼを用いた場合にも認められたことから、特殊なプロモーター配列－有用遺伝子発現増強核酸配列－特殊な有用遺伝子配列の特定の組み合わせだけで起こるのではなく、比較的一般的な現象であることが判明した。また、この有用遺伝子発現増強核酸配列の鎖長を変化させて、その効果を有する領域の特定を行った結果、HCV(HCV JTB株など)の遺伝子の5'側ヌクレオチド第181～341位(配列番号：1)に相当する部分が強い効果を有していることを見いだした。加えて、HCV1bの変異株である臨床分離株から得られた、配列番号：7に示される配列あるいは、該配列のヌクレオチド第119位をアデニンで置換したものが、その遺伝子発現増強能において特に好ましいことも見いだした。特にIRES活性に依存した翻訳過程において本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列を用いる場合には、5'-U

TR342を好適に用いることができ、IRES活性に依存しない翻訳過程（キャップ依存的翻訳過程等）において本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列を用いる場合には、5'-UTR341および5'-UTR342を好適に用いることができる。この効果は、単なる細胞培養系における蛋白質やペプチド類（例えばサイトカイン等）の産生量をin vitroで増加させる目的に利用され得るだけでなく、従来、臓器や腫瘍などに特異的であるがその活性が弱いために実用化が難しかったプロモーターと組み合わせることによって、in vivoでも効果的な遺伝子治療用ベクター等にも応用することができる。

本発明の有用遺伝子には、宿主において発現可能なペプチドをコードする核酸、細胞由来転写調節因子の結合蛋白質をコードする遺伝子もしくは転写調節因子の結合部位の配列またはこれらに類似の配列を有するデコイをコードする核酸、自殺遺伝子等が挙げられる。この遺伝子は、好ましくはゲノムDNA、cDNA、または部分的もしくは全体的に化学合成されたDNA、特に好ましくはcDNAである。

前記ペプチドは、オリゴペプチド、ポリペプチドおよび蛋白質を含み、遺伝子の転写、翻訳後に糖、脂質、リン酸、金属などによる修飾を受けたものも本発明におけるペプチドに含意される。例えば、インスリン、各種インターフェロン、エリスロポエチン、マンナン結合蛋白質、コングルチニン、ニューロシン等の有用なペプチドが含まれるが、これらに限定されることはない。

また、前記のデコイをコードする核酸とは、細胞由来転写調節因子の結合蛋白質をコードする核酸もしくは転写調節因子の結合部位の配列またはこれらに類似の配列を有する核酸を示す。これらの核酸を、団として細胞内に導入することで、転写調節因子の結合部位への結合を阻害し、転写調節因子の作用を抑制し、最終的には活性化される遺伝子群を抑制することができる可能性がある。

前記自殺遺伝子とは、アポトーシス誘発遺伝子（プログラム細胞死誘発遺伝子）、ネクローシス誘発遺伝子等を含み、その発現の結果細胞が死に導かれる遺伝子を言う。

また、これら有用遺伝子を融合蛋白質として発現させることもできる
5。融合蛋白質とは、有用遺伝子より発現される蛋白質のN末端に他の蛋白質由来のN末端ペプチド鎖を付加したり、あるいはC末端に適当なペプチド鎖を付加して発現させた蛋白質である。

次に、本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列を得るために利用することができる核酸の起源としては、遺伝子（好ましくはmRNA）の5'末端に非翻訳領域を有しているものであれば特に限定されない。また、mRNAの
10 5'非翻訳領域中にIRES領域の一部または全体を有しているものが好ましい。

以下、本発明で有用遺伝子発現増強のために用いられる核酸配列として使用可能な配列を有するウイルスにつき詳説する。

15 ウィルスは粒子内にDNAまたはRNAのどちらか一方を遺伝子として有しており、大きくDNAウイルスおよびRNAウイルスとに分類される。

DNAウイルスは、

(1) 核で増殖する二本鎖DNAウイルス：例えば、パポバウイルス科
(Papovaviridae)、アデノウイルス科 (Adenoviridae)、ヘルペスウイ
ルス科 (Herpesviridae)、

20 (2) 細胞質で増殖する二本鎖DNAウイルス：例えば、ポックスウイルス科
(Poxviridae)、

(3) 核で増殖する一本鎖DNAウイルス：例えば、パルボウイルス科
(Parvoviridae)、

25 (4) イリドウイルス：例えば、イリドウイルス科 (Iridoviridae)、およ

(5) ヘパドナウイルス：例えば、ヘパドナウイルス科 (Hepadnaviridae) に大きく分類されている。

また、RNAウイルスは、

(1) (+) 鎮一本鎖RNAウイルス：例えば、ピコルナウイルス科 (Picornaviridae) 、トガウイルス科 (Togaviridae) 、フラビウイルス科 (Flaviviridae) 、カリシウイルス科 (Caliciviridae) 、コロナウイルス科 (Coronaviridae) 、

(2) 非分節型（-）鎮一本鎖RNAウイルス：例えば、パラミキソウイルス科 (Paramyxoviridae) 、ラブドウイルス科 (Rhabdoviridae) 、フィロウイルス科 (Filoviridae) 、

(3) 分節型（-）鎮一本鎖RNAウイルス：例えば、オルトミキソウイルス科 (Orthomyxoviridae) 、ブニヤウイルス科 (Bunyaviridae) 、アレナウイルス科 (Arenaviridae) 、

(4) 二本鎖RNAウイルス：例えば、レオウイルス科 (Reoviridae) 、

(5) アンビセンスRNAウイルス：例えば、アレナウイルス科 (Arenaviridae) およびブニヤウイルス科 (Bunyaviridae) 、ならびに

(6) レトロウイルス：例えば、レトロウイルス科 (Retroviridae) に大きく分類されている。

以下に遺伝子中に5' 非翻訳領域を有する代表的DNAウイルスおよびRNAウイルスの科・属・種名を示すが、本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列は、これらのウイルス由来のものから選択してもよいし、また、これらの変異体もしくは新種由来のものから選択してもよいし、さらにこれら以外の他のDNAウイルスもしくはRNAウイルス由来のものから選択してもよい。

25 パポバウイルス科には代表的属としてバビローマウイルス (Papillomavirus) 属およびポリオーマウイルス (Polyoma virus) 属等

があり、代表的種名として、ショープ乳頭腫ウイルス (Shope papilloma virus) 、ポリオーマウイルス (Polyoma virus) および空胞形成ウイルス (Vacuolating virus) 等が挙げられる。

アデノウイルス科には代表的属としてマストアデノウイルス (Mastadenovirus) 属およびアビアデノウイルス (Aviadenovirus) 属等があり、代表的種名として、ヒトアデノウイルス (Human adenovirus) およびセロウイルス (CELO virus) 等が挙げられる。

ヘルペスウイルス科には代表的属としてアルファヘルペスウイルス (Alphaherpesvirus) 属、ベータヘルペスウイルス (Betaherpesvirus) 属、ガンマヘルペスウイルス (Gammaherpesvirus) 属等があり、代表的種名として、1型および2型単純疱疹ウイルス (Herpes simplex virus type 1, 2) 、帯状水痘ウイルス (Varicella-zoster virus) 、Bウイルス (B virus) 、サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus) 、EBウイルス (EB virus) 、HHV-6およびHHV-7等が挙げられる。

ポックスウイルス科には代表的属としてオルトポックスウイルス (Orthopoxvirus) 属、アビポックスウイルス (Avipoxvirus) 属、カプリポックスウイルス (Capripoxvirus) 属、レボリポックスウイルス (Leporipoxvirus) 属、バラポックスウイルス (Parapoxvirus) 属、スイポックスウイルス (Suipoxvirus) 属、エントモポックスウイルス (Entomopoxvirus) 属、ヤタポックスウイルス (Yatapoxvirus) 属およびモルサイポックスウイルス (Molluscipoxvirus) 属等があり、代表的種名として、ワクシニアウイルス (Vaccinia virus) 、鶏痘ウイルス (Fowlpox virus) 、ヒツジ痘ウイルス (Sheeppox virus) 、粘膜腫ウイルス (Myxomavirus) 、羊鷄口瘡ウイルス (Orf virus) 、豚痘ウイルス (Swinepox virus) 、昆虫痘ウイルス (Insectpox viruses) 、ヤタウイルス (Yata virus) および伝染性軟属腫ウイルス (Molluscum

contagiosum virus) 等が挙げられる。

パルボウイルス科には代表的属としてパルボウイルス (Parvovirus) 属、ディペンドウイルス (Dependovirus) 属およびデンソウイルス (Densovirus) 属等があり、代表的種名として、パルボウイルスB19 (Parvovirus B19) 、アデノ関連サテライトウイルス (Adeno-associated satellite virus) およびデンソヌクレオーシスウイルス (Densonucleosis virus) 等が挙げられる。

イリドウイルス科には代表的属としてイリドウイルス (Iridovirus) 属等があり、代表的種名として、真珠光ウイルス (Iridescent virus) 等が挙げられる。

ヘパドナウイルス科には代表的属としてヘパドナウイルス (Hepadnavirus) 属等があり、代表的種名として、B型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus) 等が挙げられる。

ピコルナウイルス科には代表的属としてエンテロウイルス (Enterovirus) 属、ヘパルナウイルス (Heparnavirus) 属およびライノウイルス (Rhinovirus) 属等があり、代表的種名として、1型および3型ポリオウイルス (Poliovirus type 1) 、コクサッキーウイルスA群B群 (6型以上) (Coxsackie virus) 、A型肝炎ウイルス (Hepatitis A virus) 、エコーワイルス (Echo virus) 、1A型ヒトライノウイルス (Human rhinovirus type 1A) およびエンテロウイルス (Enterovirus) 等が挙げられる。

トガウイルス科には代表的属としてアルファウイルス (Alphavirus) 属、ルビウイルス (Rubivirus) 属およびペストチウイルス (Pestivirus) 属等があり、代表的種名として、シンドビスウイルス (Sindbis virus) 、風疹ウイルス (Rubella virus) 、東部ウマ脳脊髄炎ウイルス (Eastern equine encephalomyelitis virus) およびウシ粘膜病ウイル

ス (Mucosal disease virus of cattle) 等が挙げられる。

フ ラビウイルス科には代表的属としてフ ラビウイルス (Flavivirus)
属およびヘバカウイルス (Hepacavirus) 属等があり、代表的種名として
、日本脳炎ウイルスB (Japanese B encephalitis virus) 、黄熱病ウイ
ルス (Yellow fever virus) およびC型肝炎ウイルス (atitis C virus)
等が挙げられる。

カリシウイルス科には代表的属としてカリシウイルス (Calicivirus)
属およびヘペウイルス (Hepevirus) 属等があり、代表的種名として、ノ
ーウォークウイルス (Norwalk virus) およびE型肝炎ウイルス
(Hepatitis E virus) 等が挙げられる。

コロナウイルス科には代表的属としてコロナウイルス (Coronavirus)
属等があり、代表的種名として、ヒトコロナウイルス (Human
coronavirus) 、鳥類感染性気管支炎ウイルス (Avian infectious
bronchitis virus) およびマウス肝炎ウイルス (Mouse hepatitis
virus) 等が挙げられる。

パラミキソウイルス科には代表的属としてニューモウイルス
(Pneumovirus) 属、パラミキソウイルス (Paramyxovirus) 属およびモ
ービリウイルス (Morbillivirus) 属等があり、代表的種名として、呼吸
性シンシチウムウイルス (Respiratory syncytial virus) 、ニューカッ
スル病ウイルス (Newcastle disease virus) 麻疹ウイルス (Measles
virus) 、流行性耳下腺炎ウイルス (Mumps virus) およびパラインフル
エンザウイルス (Para influenza virus) 等が挙げられる。

ラブドウイルス科には代表的属としてベジクロウイルス
(Vesiculovirus) 属およびリザウイルス (Lyssavirus) 属等があり、代
表的種名として、水疱性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus
) および狂犬病ウイルス (Rabies virus) 等が挙げられる。

フィロウイルス属には代表的属としてフィロウイルス (Filovirus) 属等があり、代表的種名として、マルブルクウイルス (Marburg virus) およびエボラウイルス (Ebola virus) 等が挙げられる。

オルトミキソウイルス科には代表的属としてインフルエンザウイルス 5 (Influenzavirus) 属等があり、代表的種名として、A型、B型およびC型インフルエンザウイルス (Influenza virus type A, B and C) および豚インフルエンザ (Swine influenza) 等が挙げられる。

ブニヤウイルス科には代表的属としてブニヤウイルス (Bunyavirus) 属等があり、代表的種名として、ブニヤヴェーラウイルス (Bunyaewera virus) 、ハンタンウイルス (Hantaan virus) およびクリミア出血熱ウイルス (Crimean-Congo hemorrhagic virus) 等が挙げられる。 10

アレナウイルス科には代表的属としてアレナウイルス (Arenavirus) 属等があり、代表的種名としてリンパ球脈路髄膜炎ウイルス (Lymphocytic choriomeningitis virus) およびラッサウイルス (Lassa virus) 等が挙げられる。 15

レオウイルス科には代表的属としてオルビウイルス (Orbivirus) 属、レオウイルス (Reovirus) 属およびロタウイルス (Rotavirus) 属等があり、代表的種名としてブルータングウイルス (Bluetongue virus) 、ヒトレオウイルス (Human reovirus) およびロタウイルス (Rotavirus) 等が挙げられる。 20

レトロウイルス科には代表的亜科としてオンコウイルス (Oncovirinae) 亜科、スプマウイルス (Spumavirinae) 亜科およびレンチビウイルス (Lentivivirinae) 亜科等があり、代表的種名として、ヒトT細胞白血病ウイルス (Human T cell leukemia virus) およびヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus) 等が挙げられる。 25

有用遺伝子発現増強核酸配列としては、これらDNAウイルスおよびRNA

ウイルスを含む全てのウイルスの核酸配列中に存在する5' 非翻訳領域もしくは非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む核酸配列、またはその断片や、これらの変異体を使用することができる。5' 非翻訳領域とは、5' 末端に存在しアミノ酸に翻訳されない領域を称し、本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列として使用するためには、IRES活性を有しても有していないなくてもよいが、有しているのが好ましい。5' 非翻訳領域には、5' -UTR ; 5' -untranslated region または5'-untranslating region、5' -NCR ; 5' -noncoding region、5' -NTR ; 5' -nontranslated region等が含まれる。

如上のウイルスから有用遺伝子発現増強核酸配列を得るための方法を以下に述べる。核で増殖する二本鎖DNAウイルスは、dsDNA（二本鎖DNA）をゲノムとして有しているので、DNA依存性RNAポリメラーゼIIによってdsDNAからmRNAを合成し、その核酸配列の5' 非翻訳領域もしくは非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列、またはその断片を調製する。また、細胞質で増殖する二本鎖DNAウイルスはdsDNAをゲノムとして有しており、ウイルス固有のDNA依存性RNAポリメラーゼによりmRNAを合成して、その核酸配列の5' 非翻訳領域もしくは非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列、またはその断片を使用することができる。核で増殖する一本鎖DNAウイルスは、ssDNA（一本鎖DNA）をゲノムとして有するので、DNAポリメラーゼによりdsDNAを合成し、その後DNA依存性RNAポリメラーゼIIによりmRNAを合成して、得られる核酸配列の5' 非翻訳領域もしくは非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列、またはその断片を使用することができる。ヘパドナウイルスは、環状の部分的に二本鎖になったDNAをゲノムとして有しているので、ギャップを修復し、スーパーコイル型DNAに変換させ、変換後のDNAをDNA依存性RNAポリメラーゼIIによりmRNAを合成し、得られた核酸配列の5' 非翻訳領域もしく

は非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列、またはその断片を使用することができる。

次いでRNAウイルスから有用遺伝子発現増強核酸配列を得るための方法を以下に述べる。 (+) 鎖RNAウイルスはmRNAをゲノムとして有しているので、該核酸配列の5' 非翻訳領域または5' 非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列またはその断片を使用することができる。非分節型および分節型を含む (-) 鎖RNAウイルスの場合は、ssRNA依存性RNAポリメラーゼ（レプリカーゼ）により相補的 (+) 鎖RNAに変換し、該核酸配列の5' 非翻訳領域または5' 非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列またはその断片を使用することができる。二本鎖RNAウイルスは分節に分かれたdsRNAをゲノムとして有しており、dsRNA依存性ポリメラーゼによりmRNAを合成し、該核酸配列の非翻訳領域または非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列またはその断片を使用することができる。アンビセンスRNAウイルスは (+) 鎖および (-) 鎖の両方をゲノムとして有し、ssRNA依存性RNAポリメラーゼによりmRNAを合成し、該核酸配列の非翻訳領域または非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列またはその断片を使用することができる。レトロウイルスの場合は、RNA依存性DNAポリメラーゼ（逆転写酵素）により、tRNAをプライマーとしてDNA-RNAハイブリッドを合成する。その後、DNAにハイブリッドしたRNAを逆転写酵素のRNase H活性により分解し、直鎖状dsDNAを合成する。これを適当に処理した後DNA依存性RNAポリメラーゼIIによりmRNAを合成し、該核酸配列の非翻訳領域または非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列またはその断片を使用することができる。

本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列としてcDNA配列が用いられる場合、上記方法で得られたmRNAから、逆転写酵素を用いてcDNAを調製することが好ましい。また、ウイルスゲノムから例えばPCR等を利用して調製

したゲノムDNA配列や、ヌクレオチド配列決定により得られた情報に基づきDNAシンセサイザー等を用いて部分的または全体的に化学合成されたDNAも好適に用いられる。

本発明の発現ベクターは、in vitroおよびin vivoの双方において、有用遺伝子を発現させ得るように構築された発現ベクターであって、本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列を好ましくはプロモーター配列の下流且つ有用遺伝子配列の上流に連結させたものであれば特に限定されない。発現ベクターの構築に用いられるベクターは市販されているものであってもよい。例えば、pUC19、pTV118N（寶酒造社製）、pUEX2（アマシャム製）、pGEX-4T、pKK233-2（ファルマシア社製）、pMAM-neo（クロンテック社製）、pGL2（プロメガ社製）、pDNA3.1+（インビトロジェン社製）等が挙げられる。本発明の発現ベクターの構築方法は、特に限定されるものではなく常法により制限酵素、リガーゼ等を利用して行うことができる。

本明細書で言う発現ベクターとは、プラスミド、λファージ、コスミド等のようなレプリコンに、有用遺伝子発現増強活性を有する核酸配列と有用遺伝子を組み込んで、有用遺伝子が複製・発現されるようにしたものを言い、実施例で使用したベクターに限定されない。例えば、コスマドよりもさらに長いDNA断片をクローニングできる発現ベクターとして、P1ファージ、F因子および酵母の人工染色体YAC等がある。また、λファージには置換型ベクターおよび挿入型ベクターが含まれ、これらは有用遺伝子の長さに応じて適宜選択することができる。

また、例えば動物細胞発現可能なベクターとして公知のものに、SV40系ベクター、ウシパピローマウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、レトロウイルスベクター等がある。

5 発現ベクターが形質転換またはトランスフェクトされる宿主細胞として細菌、特に大腸菌を使用する場合には、発現ベクターは普通少なくともプロモーター領域（プロモーター、オペレーターおよびシャインダルガーノ配列を含む）、開始コドン、有用遺伝子配列、終始コドン、ターミネーター領域等から構成される。酵母または動物細胞を宿主として用いる場合、発現ベクターは、少なくともプロモーター、開始コドン、シグナルペプチド、有用遺伝子配列および終始コドンを含むことが好ましい。また、エンハンサー配列、有用遺伝子の5'-および3'-非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位および選択マーカー¹⁰を発現ベクターに挿入することもできる。

本発明の遺伝子発現ベクターに組み込まれるプロモーターとしては、従来よりよく知られているSV40(Simian Virus 40)、SR α 、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、アクチンプロモーター、ウイルス性LTR(Long Terminal Repeat)、例えばHTLV-1 LTR、HIV-LTR、ラウス肉芽種ウイルスLTR、単純ヘルペスチロシンキナーゼウイルスプロモーター等の強力なプロモーター、弱いプロモーターに関わらず使用できる。¹⁵

真核細胞において、線維芽細胞、神経細胞、血液細胞および実質細胞等の正常細胞から、癌細胞に至る多くの細胞種に発現を期待する場合、一般的なプロモーターとしては、サイトメガロウイルス、チミジンキナーゼ(TK)、 β -アクチンおよびSV40初期遺伝子プロモーター等が挙げられる。エンハンサーは通常、プロモーター配列とセットになっているのでそのまま利用することができる。²⁰

主として、これらの哺乳動物由来の細胞内で有用遺伝子を高発現させることができるプロモーターは宿主に適合する限り、本発明のプロモーターとして適宜選択して用いることができる。また、遺伝子を導入し発現させる細胞および組織が特定されている場合には、細胞に特異的なプロモーターを用いることができる。²⁵

ロモーターを選択することができる。さらに、これらプロモーターをホモあるいはヘテロに組合せることにより、さらに高発現が期待でき、発現したタンパク質が安定であるという効果が得られる場合がある。

一方、原核細胞において使用されるプロモーターとして、PBAD、PL、
5 trc、T7、SP6、T3、lac等がある。

主として、これらの原核細胞由来の細胞内で有用遺伝子を高発現させ
うことができるプロモーターは宿主に適合する限り、本発明のプロモー
ターとして適宜選択して用いることができる。また、遺伝子を導入し発
現させる細胞および組織が特定されている場合には細胞に特異的なプロ
モーターを選択することができる。さらに、これらプロモーターをホモ
あるいはヘテロに組合せることにより、さらに高発現が期待でき、発現
10 したタンパク質が安定であるという効果が得られる場合がある。

一方、酵母において使用されるプロモーターとして、GAL1、AOX1、CU
P1、PGK等がある。

15 遺伝子発現ベクターに組み込み、目的とするベクターのみを回収する
ための選択マーカーとしては、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下DHFRと略す
）遺伝子（メトトレキサート耐性遺伝子）、neo遺伝子（G418耐性遺伝子
）等が挙げられ、例えば、DHFR遺伝子が欠損しているCHO細胞を用いて、
DHFR遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミジンを含まない培
20 地によっても選択できる。また、メトトレキサートの濃度を上げて培養
し、耐性細胞を選択することにより、有用遺伝子を細胞内で発現させ、
さらに高発現の細胞株を得ることもできる。

構築された発現ベクターの例は、図2～4、7および8ならびに11
および12に概略示されるとおりである（実施例2～6、8～12参照
25 ）。

本発明は、この様に構築された遺伝子発現ベクターで形質転換または

5

トランスフェクトされた宿主細胞、例えば、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞および微生物細胞（大腸菌、枯草菌、酵母等）で、発現ベクターに組み込まれた有用遺伝子を発現することができる宿主細胞も企図するものである。好ましい宿主細胞として、プロモーター配列と有用遺伝子配列との間に組み込まれた有用遺伝子発現増強核酸配列の活性を最大限に引き出すことができる宿主細胞が選択される。

10

本発明の宿主細胞たる動物細胞としては、ヒト由来の細胞が挙げられるが、本発明に使用した有用遺伝子発現増強活性を有する核酸配列がその動物細胞内において有用遺伝子の発現を増強させることができる細胞であれば特に限定されるものでない。例えば、CHO細胞、COS細胞、BHK細胞、Vero細胞、ミエローマ細胞、HEK293細胞、HeLa細胞、Jurkat細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスFM3A細胞、マウス纖維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞等がある。また、微生物細胞としては、例えば大腸菌および枯草菌等の細菌類ならびにサッカロマイセス・セレビシエおよび麦酒酵母等の酵母類等が含まれる。また、植物細胞としては、綿植物細胞、アラビドブシス細胞等が挙げられる。

15

前記の通り、有用遺伝子発現増強核酸配列はIRES活性を有することが好ましいが、ウイルスのIRESは構造的にも多様であり、その機能発現に関する宿主細胞群の要求性も異なるうえウイルス感染により局在性の変化するIRES関連分子群も存在するため、IRES領域を含む核酸配列を本発明において用いる場合にはその核酸配列に応じて宿主を適宜選択することが好ましい。

20

さらに、目的の発現増強が行える適當な宿主細胞が入手できない場合には、用いる宿主細胞に形質転換等により修飾を施すことができる。例えば、宿主細胞を修飾する方法としてトランス因子（例えば、La、p25、PTB等）を宿主細胞に導入、もしくは宿主細胞内で発現することができる

5 ように形質転換することもできる。IRESの機能発現にはキャップ依存的翻訳開始に関わる分子群の多くが動員されるが、その他のトランス因子も必要であるとされる。本明細書で言うトランス因子とは、宿主細胞由
來の分子群であって、直接的もしくは間接的に本発明の有用遺伝子発現
増強活性を引き出すかまたは増強させることができる分子群を示す。翻
訳の開始にはRNAの高次構造の他に、IRESに作用するトランス因子が重要
な役割を果たしているが、必要とされるトランス因子はIRES毎に異なり
、機能発現に至る機構もIRESによって様々であることが予想される。

前記発現ベクターの宿主細胞への導入法としては、例えば、リボポリ
10 アミン法、DEAE-デキストラン法、ハナハン法、リボフェクチン法、リン
酸カルシウム法によるトランスフェクション、マイクロインジェクション
およびエレクトロポーリーション等の方法がある。

原核細胞のRNAポリメラーゼに親和性を有するプロモーターを真核細胞
にて用いる場合、またはIRES活性に依存した翻訳過程を利用する場合の
15 いざれであっても、適当な処理を施すことにより本発明の実施に応用で
きる。例えば、本発明の実施例に記載したように、プロモーターに適合
するポリメラーゼの遺伝子を予め導入した宿主を使用することにより、
真核細胞の細胞質で有用遺伝子を発現させることができる。導入する方
法として、ウィルスエンベロープを用いたリポソーム製剤、エレクトロ
20 ポーリーション法、リン酸カルシウム法およびウィルスベクター等の公
知の方法を用いることができる。特に、臨床においては、HVJリポソーム
、VSVリポソーム、カチオニックリポソーム等のリポソーム製剤あるいは
アデノウィルスベクター、レトロウィルスベクター等のウィルスベクタ
ーを用いることが有用である。臓器あるいは部位特異的にリポソーム製
剤あるいはウィルスベクター等を用いて原核生物のRNAポリメラーゼが発
25 現するように真核細胞に導入し、該RNAポリメラーゼに親和性を有するブ

ロモーターを用いた発現ベクターにて有用遺伝子を発現させることにより、臓器あるいは部位特異的に有用遺伝子を発現させることができる。この方法はリボソーム製剤およびウィルスベクターによって有用遺伝子が望ましくない部位に導入された場合であっても、プロモーター特異的
5 ポリメラーゼが発現していない細胞にあっては有用遺伝子が発現されないため、副作用の軽減・臓器特異性の向上等の利点がある。この場合特に野生型HCV由来の5'-UTR341よりも変異型HCV由来の5'-UTR342配列を用いる方が、有用遺伝子の発現効率が高いことを実施例9～12で示している（後述）。

10 以上述べたように、プロモーター・宿主・作用原因・翻訳過程の相違・発現環境・発現方法等に関わらず、本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列は結果として有用遺伝子発現を増強させることができる。

さらに、前記遺伝子発現増強核酸配列を含む発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を含み、有用遺伝子産物を効率よく発現している生物（動物、植物、昆虫など）も本明細書に開示する
15 。

また、前記宿主細胞を培養して有用遺伝子産物を単離することによる、またはかかる宿主細胞を保有する生体内で目的とする遺伝子産物を生産する有用遺伝子産物の製造方法、有用遺伝子の発現方法、発現ベクター
20 を利用した遺伝子発現の増強方法も本発明により企図される。

本発明の修飾された実施態様として、新規5'非翻訳領域および／またはIRESを有する核酸配列を探索・発見する方法が含まれ、この方法によつて取得された配列もしくはそれらの断片、または5'非翻訳領域から翻訳領域までを含む配列もしくはその断片や、これらの変異体を有用遺伝子発現増強核酸配列として用いることもできる。
25

新規5'非翻訳領域および／またはIRESを有する核酸配列を探索・発見

する方法の例を以下に説明する。ポリオウイルス感染細胞内ではeIF4F (eIF4E, eIF4AおよびeIF4 γ の複合体) のサブユニットeIF4 γ (p220) が切断を受けることが知られている。このため、感染細胞内ではeIF4Fのレベルは低下する。この様な状態は熱ショックによつても作り出すことができる。しかしキャップ結合蛋白質eIF4Eの脱リン酸化が起つり、キャップ構造への親和性が低下してしまう (Lamphear, B. J. *et al.* ; *J. Biol. Chem.*, 266, 2789, 1991)。この様な状態では、eIF4Fの要求性が高いmRNAの翻訳は抑制され、この要求性が低いmRNAまたはIRESを有するmRNAのみが、mRNAとして機能して翻訳される。以上のような知見に基づき、熱ショック等を利用してIRES (類似) 活性を含む核酸配列を新たに発見することができる。実際に、ポリオウイルス感染細胞内でも機能しているmRNAが探索され、その配列に含まれるIRESが同定されている (Macejak, D. G. *et al.* ; *Nature*, 353, 90, 1991)。また、別の例として、5' 非翻訳領域が長く、その領域内に複数のAUG配列を持つ核酸配列を遺伝子配列バンクなどで探索する方法がある。実際に、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の発生・分化に関するmRNAにこのような配列が数多く存在することが判明し、アンテナベディア遺伝子 (Antp) から転写される2つのmRNA上にIRESが同定されている (Oh, S. K. *et al.* ; *Genes Dev.*, 6, 1643, 1992)。このような発生・分化段階における動物細胞中では、熱ショックを受けた細胞内と同様にeIF4Eのリン酸化が十分でなく、キャップ依存的翻訳開始機構は機能していない状態にあると考えられている (Bonneau, A. -M. *et al.* ; *J. Biol. Chem.*, 262, 11134, 1987)。

さらに、前記したように、c-myc、BiP (免疫グロブリン重鎖結合タンパク質) 、FGF-2、PDGF 2、eIF4G、カリウムチャンネルなど、真核細胞のmRNAの5' 非翻訳領域にIRES活性を有する領域が認められることが報告

されており、真核細胞でも実際にキャップ非依存的機構により翻訳開始がなされることも示されている。

また、IRESを同定する方法として、2つのシストロンをもつmRNAを利用することができる。この方法では、IRESを有する第2シストロンの翻訳は、第1シストロンの翻訳が阻害されている条件下でも行われることを利用する。最近、EMCVの、IRESを有する環状RNAは、スバルソマイシンにより翻訳の伸長反応が阻害されている条件下でもRNAへのリボソームの結合が起こることが示されている (Chen, C. et al. ; Science, 268, 415, 1 995)。

10

[図面の簡単な説明]

第1図は、HCV遺伝子の5' 非翻訳領域における二次構造の概略を示す模式図である。

第2図は、本発明の一実施態様である、有用遺伝子発現増強核酸配列を含む発現ベクターを示す模式図である。

第3図は、本発明の別の実施態様である、有用遺伝子発現増強核酸配列を含む発現ベクターを示す模式図である。

第4図は、本発明のさらに別の実施態様である、有用遺伝子発現増強核酸配列を含む発現ベクターを示す模式図である。

第5図は、2種のHCVの5' 非翻訳領域 (HCV1-341 : 5' -UTR₃₄₁ およびHCV-342 : 5' -UTR₃₄₂) の核酸配列の比較を示す図である。

第6図は、HCVの変異株由来の核酸配列の5' 非翻訳領域における二次構造上での変異部位を示す模式図である。

第7図は、本発明のさらに別の実施態様である、有用遺伝子発現増強核酸配列を含む発現ベクターを示す模式図である。

第8図は、第7図に示す実施態様である、有用遺伝子発現増強核酸配

20

25

列を含む発現ベクターを示す概略図である。

第9図は、第7および8図に示すベクターを用いた、in vitro系での発現増強の効果を示すグラフである。

5 第10図は、第7および8図に示すベクターを用いてトランスフェクトされたHep細胞における発現増強の効果を示すグラフである。

第11図は、本発明のさらに別の実施態様である、有用遺伝子発現増強核酸配列を含むビ・シストロン発現ベクターを示す模式図である。

第12図は、第11図に示す実施態様である、有用遺伝子発現増強核酸配列を含むビ・シストロン発現ベクターを示す概略図である。

10 第13図は、第11および12図に示すベクターを用いてトランスフェクトされたCOS細胞における発現増強の効果を示すグラフである。

[発明を実施するための最良の形態]

以下、実施例に基づいて本発明をさらに説明するが、本発明の範囲はこれら実施例により限定的に解釈されるべきではなく、当業者により想到される種々の改良、修飾された態様も本発明に包含される。

先ず、以下の実施例において本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列を含む発現ベクターの宿主細胞へのトランスフェクションの方法、トランセフェクタントの同定（ルシフェラーゼ活性のアッセイ）について概略説明する。

[トランスフェクション]

後記実施例2～6における、宿主細胞への発現ベクターのトランスフェクションは、ProFection Mammalian Transfection Systemsキット（Promega社製）を使用し、リン酸カルシウム法によって行った。使用した細胞系は実施例によって異なるが、トランスフェクションを行なう前日に細胞を6ウェルプレートの各ウェル（直径35mm）に、翌日使用する際にウ

エルの約50%の細胞濃度になるように播種した。すなわち、 5×10^5 の細胞を3mLの培地に播種して、37°C、5%CO₂下で一夜培養したもの用いた。

トランスフェクション実施当日に、リン酸カルシウムと発現ベクターDNAとの沈殿を細胞培養液に加える前に、上記培養細胞の培養上清を吸引して除き、新鮮な培地を加えた。培地はすべての実験に共通で、10%牛胎児血清を添加したDMEM培地（ダルベッコ変法イーグル培地：Dulbecco's Modified Eagle Medium）(GIBCO社製)を使用した。

リン酸カルシウムと発現ベクターDNAとの沈殿は、以下のようにして作製した。すなわち、ポリスチレンチューブを2本（AおよびB）用意し、チューブAの方にキットに付属の水、CaCl₂および発現ベクターDNAを混合し、チューブBの方にキットに付属の2×HEPES（50mM HEPES, pH=7.1, 280 mM NaCl, 1.5mM Na₂HPO₄）をチューブAに入っている液量と等量注入した。チューブBの中にチューブAの液を全てを混ぜながらゆっくりと滴下し、30分間室温放置すると液がうっすらと白濁してくる。これをボルテックスミキサーで良く混合した後に、1つのウェルの細胞培養液の中にチューブ中の液をすべて滴下した。この結果ウェルに投入されるDNA量は5μgとなるようにした。次いで、37°Cで6時間培養後に培養上清を吸引して除き、PBS(-)（リン酸緩衝性生理食塩水（pH 7.4）：137 mM NaCl、8.10 mM Na₂HPO₄（無水）、2.68 mM KCl、1.47 mM KH₂PO₄）で細胞表面を2回洗浄した。その後、新鮮な培地を加えて約48時間37°Cで培養した。

[ルシフェラーゼ活性のアッセイ法]

ルシフェラーゼ活性のアッセイは、pGL2 ベクターを使用した実施例2、3、4、10および12ではLuciferase Assay system (Promega社製)または、その他のベクターを使用した実施例5、6、9、10および12ではDual Luciferase Assay System (商標名、Promega社製)キットを用いて行った。上記のようにトランスフェクションを行った約48時間

後に、キットの説明書に従って、トランスフェクション後の各ウェルの細胞よりルシフェラーゼ酵素液を得るために、キットの中のlysis bufferを1ウェル当たり $500\mu l$ づつ加えて細胞中のルシフェラーゼを抽出した。

こうして得られた酵素液につきルシフェラーゼ活性を測定した。すなわち、Luciferase Assay System (Promega社製、実施例2、3、4、10および12) またはDual Luciferase Assay System (Promega社製、実施例5、6、9、10および12) キットを使用し、キットの説明書に従って、 $100\mu l$ のLuciferase Assay Reagent に $20\mu l$ の酵素液を加え、ルミネッセンスリーダーBRL-301(Aloka社製) を使って各サンプルを室温で1分間測定した。

ルシフェラーゼ活性を酵素液の蛋白質量当たりで示すために、ルシフェラーゼを測定した後の残りの酵素液中の蛋白質含量をCoomassie Plus Protein Assay Reagent (PIERCE社製) と添付の牛アルブミン標準液を用いて測定した。

実施例2～6において、それぞれの実験はトランスフェクションの段階から二重試験または三重試験を行った。すなわち、一種類のDNAに対して2～3ウェルで、別々に宿主細胞へのトランスフェクションを行い、その各々から得られた酵素液のルシフェラーゼ活性を測定した。後掲の表1～5に示されるデータは、同じトランスフェクタント由来の酵素液の活性を2～3回測定した結果ではない。

〔実施例1〕：HCVの核酸配列断片の作製

有用遺伝子発現増強核酸配列として、HCV 5' 非翻訳領域由來のIRES領域を含むcDNA配列を調製した。HCV感染患者の血清より常法によってmRNAを抽出し、逆転写酵素 (GIBCO BRL社製) を反応させて、cDNAを合成した。このcDNAを鑄型にして、IRES活性を有するHCVの5' 非翻訳領域（配列番号：1、ヌクレオチド第1～341位）とコア蛋白質翻訳領域の一部（同

、ヌクレオチド第342～713位) を含む特定の断片を増幅するため、以下の配列を有するプライマー(5'末端側に制限酵素HindIII認識部位を付加したもの、配列番号：2～6)を用いてPCRを行った。

5' HindHCV001 5'-ccc aag ctt gcc agc ccc ctg atg ggg gcg a-3' (配列番号：2)

5' HindHCV180 5'-ccc aag ctt ctg gca att ccg gtg tac tca c-3' (配列番号：3)

5' HindHCV181 5'-ccc aag ctt gac gac cggt gtc ctt tct tg-3' (配列番号：4)

10 3' HindHCV341 5'-ccc aag ctt ggt gca cggt tct acg aga cct-3' (配列番号：5)

3' HindHCV713 5'-ccc aag ctt atc gat gac ctt acc ca-3' (配列番号：6)

PCRは、94°Cで30分間、55°Cで30分間および72°Cで30分間を20サイクルにて行い、しかしてHCVの5'非翻訳領域を含む断片、すなわち、配列番号：1のヌクレオチド第1～180位、第181～341位、第1～341位、第181～713位および第1～713位の配列を有するDNA断片が得られた。これら断片を、以下、それぞれHCV1-180、HCV181-341、HCV1-341、HCV181-713およびHCV1-713と称する。

20 [実施例2]：トランジェントトランスフェクション

ベクターとしてpGL2B(=pGL2Basic、Promega社製、ホタル・ルシフェラーゼをコードするcDNA配列およびSV40 polyAシグナルを含み、プロモーター、エンハンサー、発現増強核酸配列は含まない)ならびに、pGL2C(=pGL2Control、Promega社製、ホタル・ルシフェラーゼ、SV40 polyAシグナル、SV40 初期プロモーター／エンハンサーを含み、発現増強核酸配列は含まない、図2(a)参照)入手し、pGL2B UTR5'-3' (pGL2BのHi

nd III部位に実施例1で得られたHCV1-341が5'-3'の方向に挿入されている、図2（b）参照）を以下のとおりに調製した。

HindIII認識部位が付加されたPCR産物である前記HCVのcDNA断片のうち HCV1-341と、ベクターpGL2Bを、それぞれHindIIIを用いて、37°Cにて一夜反応させて消化した後、分子内でのセルフライゲーションを防ぐために、アルカリリフォスファターゼ（ベーリンガー・マンハイム社製）により37°Cにて30分間処理を行った。DNAライゲーションキットVer.1（TAKARA）を用いマニュアルに従って、HindIII消化後のベクターとcDNA断片とのライゲーション反応を行った。

得られたベクターDNAをコンビテント細胞に導入して形質転換細胞を得、コロニーの中からHCVの各断片を含む組み換え体を選択し、常法に従つてプラスミドDNAを精製した。

トランسفエクションのため、上記3種のいずれかのベクターDNAを5 μgと、トランسفエクション用の前記キット中のCaCl₂液18.5 μlをチューブに加え、水を加えて150 μlとしたものを先に述べたチューブAとし、チューブBには2×HEPES 150 μlを入れた。宿主細胞としてCOS1細胞を使用し、上記の手順に従つてトランسفエクションを行なった後、それぞれルシフェラーゼ活性を測定した。

pGL2Bベクターはルシフェラーゼ活性を示さないので、これをトランسفエクションした細胞の酵素液をブランクとして用いた。ルシフェラーゼ活性は、蛋白質1 mg当たりの相対発光単位（U/mg）で表した。

こうして得られた結果を以下の表1に示す。

表 1

ベクター	No. 1 (U/mg)	No. 2 (U/mg)
pGL2C	1623	1616
pGL2B UTR5'-3'	60	52

この結果から、プロモーターを含まないベクターpGL2BにHCV1-341が挿入されたベクターpGL2B UTR5'-3'でトランスフェクトされた宿主細胞のルシフェラーゼ活性は非常に低い数値であることが明らかである。従つて、HCVの遺伝子の5' 非翻訳領域（配列番号：1、ヌクレオチド第1～34位）自体にはプロモーターとしての活性が無いか、またはあったとしても非常に微弱であることが示された。すなわち、本発明の実施例で用いたベクターに含まれるプロモーターよりも、HCVの5' 非翻訳領域に強いプロモーターとしての強い活性があるために、見かけ上HCVの5' 非翻訳領域に遺伝子発現増強効果があるよう見えててしまうという可能性が否定される。HCVはRNAウイルスであり、複製の過程にDNAに転換されることはないので遺伝子の5' 非翻訳領域にプロモーター活性を持っていなくても妥当であるといえる。

実施例3：トランジェントトランスフェクション

本発明の有用遺伝子発現ベクターを構築するため、実施例2に記載のpGL2CのHind III部位にHCV1-341が5' -3' 方向に挿入されたpGL2C UTR5'-3'（図2（c））を、前記pGL2B UTR5'-3' の調製法と同様にHindIIIを用いて調製した。

pGL2CまたはpGL2C UTR5'-3' のいずれかのベクターDNAを5 μg用い、実

施例 2 におけると同様にしてCOS1細胞にトランスフェクトし、ルシフェラーゼ活性を測定した。

こうして得られた結果を以下の表 2 に示す。

5

表 2

10

ベクター	No. 1 (U/mg)	No. 2 (U/mg)
pGL2C	1123	1360
pGL2C UTR5' -3'	4758	4637

15

このデータは、発現ベクターの中のプロモーター配列とルシフェラーゼ遺伝子との間にHCV1-341を5'-3' の方向に挿入するとルシフェラーゼ活性が上昇することを明示している。従って、HCVの遺伝子の5' 非翻訳領域に遺伝子発現増強効果があることが示唆された。

20

実施例 4 : トランジェントトランスフェクション

実施例 3 のpGL2C UTR5' -3' に替えて、pGL2CのHind III部位にHCV1-341が実施例 3 とは逆の3' -5' 方向に挿入されたpGL2C UTR3' -5' (図 2 (d) 参照) を作製し、実施例 3 と同様の実験を行った。この結果を以下の表 3 に示す。

表 3

5

ベクター	No. 1 (U/mg)	No. 2 (U/mg)
pGL2C	177	197
pGL2C UTR3' -5'	156	96

この結果から明らかなとおり、HCV1-341を3' -5' 方向に挿入した場合実施例3で認められたような活性増強効果は全くなく、むしろ活性が低下していた。この結果と実施例3の結果を総合して、HCVの5' 非翻訳領域には、その塩基配列特異的に、そして5' -3' の方向に依存して有用遺伝子産物発現増強効果があることが示される。また、この配列は従来のエンハンサー配列ともその本質を異とすることも明らかである。

15 なお、本実施例において、pGL2Cがトランスフェクトされた細胞の活性値は、実施例2や実施例3における結果に比べて1/10またはそれ以下であるが、これは本実施例でトランスフェクションの効率が実施例2や実施例3の1/10であったことによるものであり、pGL2Cとの比較においてpGL2C UTR3' -5' による効果を考察しているので、相対的な活性値の低さについて問題ないものと考える。

実施例5：トランジェントトランスフェクション

本発明による有用遺伝子発現増強の効果がプロモーター、有用遺伝子、宿主細胞等に特異的なものであるか否かを検討するため、本実施例では、実施例2～4で使用したものとは相違するプロモーターと、起源の異なるルシフェラーゼを含むpRLTKベクター (Promega社製、HSV TK プロモーター、SV40 polyAシグナルおよびRenilla Luciferaseを含む、図3

(a) 参照) を用い、宿主細胞としてはヒト肝癌由来Hep G2細胞を使用した。

実施例 1において調製したHCVの5' 非翻訳領域を含むcDNA断片、 HCV1-180, HCV1-341, HCV181-341またはHCV181-713をそれぞれ、 いずれもpRL TKのHind III部位に実施例 2に記載の手順により挿入、 pRLTK 1-180 (図 3 (b)) , pRLTK 1-341 (図 3 (d)) , pRLTK 181-341 (図 3 (c)) , およびpRLTK 181-713 (図 3 (e)) を作製した。 pRLTK 1-341は、 実施例 3におけるpGL2C UTR5' -3' と同じ発現増強核酸配列を挿入したもの、 そしてpRLTK 1-180はpRLTK 1-340の前半分、 pRLTK 181-341は後半分に相当する配列を挿入したものである。 pRLTK 181-713はpRLTK 1-341よりも192塩基対だけ長い配列を含み、 この192塩基対はコア蛋白質の翻訳領域に相当する。

宿主細胞へのトランスフェクションにあたり、 1ウェル当たりに用いたDNA量は実施例 2、 3 および 4 と同じく $5\mu\text{g}$ でその他の条件も全く同一とした。

但し、 ルシフェラーゼとしては上記実施例と異なり、 ホタルではなくウミシイタケ (Renilla) 由来のものを用いたので、 アッセイキットは先に述べたように Dual Luciferase Assay Systemを使用した。

それぞれのベクターをトランスフェクトした宿主細胞に認められた活性を以下の表 4 に示す。

表 4

ベクター	No. 1 (U/mg)	No. 2 (U/mg)	No. 3 (U/mg)
pRLTK	21	65	42
pRLTK 1-341	314	125	291
pRLTK 1-180	227	175	164
pRLTK 181-341	1,035	1,036	1,111
pRLTK 181-713	482	381	491

10

この結果、HCV1-180, HCV1-341, HCV181-341またはHCV181-713のいずれの配列を用いても活性増強効果が顯示され、実施例2、3および4で観察された活性増強効果が、SV40 プロモーターとホタル・ルシフェラーゼの組み合わせで、しかもCOS1細胞にトランスフェクトした場合のみに認められる特異的なものではないことを示している。さらに、pRLTK 181-341を用いた場合に特に効果が強く、HCV1-341の核酸配列による効果は、その配列のうちヌクレオチド第181～341位に起因している可能性を示している。

従って、本実施例によって、プロモーターや有用遺伝子の起源や種類が違っても、また宿主細胞が異なっても、やはり5' 非翻訳領域(配列番号：1、ヌクレオチド第1～341位に示される配列)は遺伝子発現増強効果を有していること、この配列のうちヌクレオチド第181～341位が最も強い効果を有するので、当該配列中に本発明による効果を生み出す配列が存在することが示唆された。また、5' 非翻訳領域のみならずコア蛋白質の翻訳領域の一部(配列番号：1、ヌクレオチド第342～713位)をも含む配列を用いても発現増強の効果は認められることも明らかになった。

実施例 6：ステイブルセルライン

本実施例では、実施例2～5とは異なり、宿主細胞のトランジェントトランスフェクションによる結果ではなく、トランスフェクションの後安定に発現ベクターが組み込まれて、導入した遺伝子の発現が継続され得る系（ステイブルセルライン）における、本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列の効果を確認した。ステイブルセルラインは、抗生物質G418（ネオマイシン）に対する耐性遺伝子neoを有する発現ベクターを使って宿主細胞をトランスフェクトし、次いでG418を含む培養液中でも増殖する細胞のみを集めることによって得ることができる。

ベクターとしては先ず、pcDNA3.1+（Invitrogen社製）を入手し、このベクターからT7プロモーターの配列を除いたものを作製し、そのHindII/XbaI部位に実施例5と同様のウミシイタケ・ルシフェラーゼを組み込んだプラスミドpcDNARL（図4（a））を調製した。この発現ベクターにおけるプロモーターおよびエンハンサーはCMV、polyAシグナルはウシ成長ホルモン由来のものである。

前記HCV1-180、HCV1-341、HCV181-341、HCV181-713またはHCV1-713の各cDNA断片をpcDNARLベクターに組み込んで、それぞれプラスミドpcDNA RL 1-180、pcDNARL 1-341、pcDNARL 181-341、pcDNARL 181-713またはpcDNARL 1-713を調製した。

これら各発現プラスミドの宿主細胞へのトランスフェクションは、実施例2に記載したと同様に実施した。但し、ベクターDNAを10 μ gとCaCl₂を37 μ l、これにキットに添付の水を加えて300 μ lとしたものをチューブA液に、チューブBには2×HEPESを300 μ lを入れて用いた。また、宿主細胞であるHepG2細胞は、あらかじめコラーゲンをコーティングしたT75プラスコ（細胞接着面積が75cm²の培養プラスコ）に約50%の細胞密度となるように準備しておいたものを使用した（5×10⁵細胞数／20mL培地）

実施例2～5では、トランスフェクト後の細胞を約48時間培養した後に、細胞中のルシフェラーゼ活性を測定して結果を求めたが、本実施例では約48時間経った頃にステイブルセルラインを獲得するべくG418を培養液中に800 μg/mlとなるように加えた。37°Cで培養を継続すると約1週間後にはほとんどの細胞が死滅してしまうが、上記各プラスミドDNA（耐性遺伝子neoを有する）を含む細胞は生き残り、コロニーを形成する。このコロニー群がある程度成長したら新しいフラスコに移し、37°C、5%CO₂で培養して増殖させると共に、細胞の一部を液体窒素に保存した。

ここでは、形成されたコロニーを一つ一つ単離して増殖した訳ではなく、生き残った細胞を含む全てのコロニーの混合物として回収したので、各cDNA断片由来のステイブルセルラインは、全て同条件で得られたものといえる。

こうして増殖した各ステイブルセルラインの6ウェルプレートの1ウェル(直径35mm)に相当する面積分の細胞から、前記の通りに酵素液を抽出してルシフェラーゼ活性を測定した。この結果をpcDNARL、pcDNARL 1-341 (図4(c) 参照) およびpcDNARL 181-341 (図4(b) 参照) につき以下の表5に示す。

20

表 5

ベクター	No. 1 (U/mg)	No. 2 (U/mg)
pcDNARL	69, 593	66, 062
pcDNARL 1-341	89, 987	86, 442
pcDNARL 181-341	198, 413	201, 365

この結果、ステイブルセルラインでも実施例5と同様にHCV181-341のcDNA配列により活性が最も増強されることが示された。また、この実験で使用されたプロモーターは実施例2～5で用いたプロモーターとは別のものであるが、やはり遺伝子発現増強効果は示され、本発明による効果が特定のプロモーターに依存するものでないことが明らかになった。

従って、永久発現細胞においても、トランジェント系の結果に示された有用遺伝子発現増強効果は顯示されたので、実施例2～4において、比較されたグループ間によってルシフェラーゼを発現している細胞数が違うために、発現活性に差があるかのごとく見受けられたのではないかという疑問が解決された。

[実施例7]：HCV1b変異株由来の核酸配列断片の作製および配列

HCV1bの5'非翻訳領域由来のIRES領域を含む別のcDNA配列を調製した。実施例1とは異なるHCV1b陽性患者の血清から、実施例1に記載したと同様にcDNAを合成した。この患者は、高ウイルス血症を呈しており (10^5 ウィルスコピー数／ml血漿)、ウイルスの複製が非常に活発であり、従つてそのHCVにおける翻訳が高効率で行われている可能性を有するものであった。このcDNAを錆型にして、HCV1b変異株の5'非翻訳領域からなる断片を、以下の配列を有するプライマー（5'端にHind III（下線部）を付加したセンスプライマー（配列番号：8）およびアンチセンスプライマー（配列番号：9））を用いてPCRを行い、増幅した。

cccaagcttgccagccccctgatggggc (配列番号：8)

ggtgacggtctacgagacc (配列番号：9)

PCRの反応条件は、実施例1に記載したと同様に設定した。得られたPCR産物は、Hind IIIおよびApaL Iを用いて消化し、アガロースゲル電気泳動にて精製した。

この断片を定法により配列決定して、配列番号：7に示される342ヌクレオチドからなる配列を得た。この配列を、従来より知られているHCV1b (GenBank Accession Number : D00832) 由来の5' 非翻訳領域の前記断片 HCV1-341 (配列番号：1、第1～341位) と比較したところ、図5にそれぞれ5'-UTR₃₄₂および5'-UTR₃₄₁として示すように、変異株由来の5' 非翻訳領域は、①第119位のアデニンがシトシンに置換されており、且つ②第207位にチミジンが挿入されていることが判明し、これらの変異は同じ検体由来の他のcDNAクローンからも検出された。こうして同定された各々の変異のIRES領域における位置は、図6に示すように、それぞれ高度保存領域以外の領域、ピリミジンリッチ領域の内部または近傍、トランス因子の結合領域の近傍あるいはBoxAおよびBoxBの近傍に存在していた。

[実施例8] : HCV1b変異株由来の発現増強配列を含むベクターの構築

実施例7で得られた断片（以下、HCV-342）による発現増強の効果と、さらにこの断片における上記変異が及ぼす発現増強効果に対する影響を調べるために、T7プロモーター、発現増強配列（HCVの5' 非翻訳領域由来断片）、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ（Rluc）遺伝子およびT7ターミネーターを含むベクターを、pGEMEX-1ベクター（Promega社製）より構築した（図7および8参照）。

Rlucとしては、pRL-TK（Promega社製）から、以下の配列を有するプライマー（5' 端にApa I切断部位（下線部）を付加した、センスプライマー（配列番号：10）および5' 端にAsc I切断部位（下線部）を付加したアンチセンスプライマー（配列番号：11））を用いて増幅し、次いでそのPCR産物をApaIおよびAsc Iで消化して、アガロースゲル電気泳動にて精製したものを使用した。

25 accgtgcaccatgacttcgaaagtttatga (配列番号：10)
ttggcgccatttattgttcattttgagaa (配列番号：11)

HCV-341を含むベクターpT7-RL-UTR₃₄₁は、図7および8の（b）に、HCV-342を含むベクターpT7-RL-UTR₃₄₂は、同図面の（c）に、それぞれ示すとおりの構造を有する。

各ベクターは、pGEMEX-1ベクターから予めT7 gene 10を全て除去し、
5 そのT7プロモーターとT7ターミネーターとの間にHind III/Asc I制限酵
素部位を導入しておいたものを、発現増強配列としてのHCV-342またはH
CV-341のいずれかと、前記Rlucと共に、実施例2に記載の方法に準じて
ライゲーション反応を行うことによって調製した。対照となる、発現増
強配列を含まないベクターpT7-RLは、図7および図8の（a）に示すよ
うに、Rlucレポーター遺伝子をT7プロモーターの直下、T7ターミネータ
ーの直前に連結した。
10

さらに、HCV-342における第119位でのアデニンからシトシンへの置換
による影響を確認するため、HCV-341の第119位にかかる置換を起こした
配列を含むベクターとして、pT7-RL-UTR_{341C}（図8（d））を調製し、第
15 207位へのチミジンの挿入による影響を確認するため、HCV-342の第119位
のシトシンをアデニンに置換した配列を含むベクターとして、pT7-RL-U
TR_{342A}（図8（e））を調製した。それぞれの変異配列を含むベクターは
、PCRを用いた突然変異導入法により得られたものを、上記と同様にして
調製した。
20

各ベクターに導入したPCR産物は全て、配列決定により目的とする配列
を含むことを確認したものを用いた。

[実施例9]：ラン・オフRNA合成およびin vitro翻訳

実施例8で得られたプラスミドベクターについて、以下の通りにラン
25 オフRNA合成およびin vitro翻訳によってルシフェラーゼを発現させることにより、導入した発現増強配列の効果を同定した。

それぞれの環状のプラスミドベクターをAsc Iで消化することによって

直鎖状となし、各DNAをT7 RNAポリメラーゼ（Boehringer Mannheim社製）によるラン・オフRNA合成の鋳型として用いた。転写反応の条件は、製造元のプロトコルに従うものとした。転写反応終了後、10 UのRQ DNase I (Promega社製) を反応混液に添加して、鋳型として用いたDNAを消化分解し、次いでRNAをフェノールークロロホルムで抽出した後、エタノール、7.5 M酢酸ナトリウムを用いて沈降させた。合成されたRNAの濃度は、分光光度計を用いて定量した。

次に、それぞれのRNAから、ヌクレアーゼによる処理済のウサギ網状赤血球抽出液 (Rabbit Reticulocyte Lysate ; RRL、Promega社製) にて、i n vitro翻訳を行った。翻訳のための反応は、1 μgのRNA、17.5 μlの上記抽出液、10 UのRNase阻害剤 (RNasin、Promega社製) 、20 μMのアミノ酸混合液 (Promega社製) を含み、120 mM塩化カリウムの存在下、25 μlの総容量の反応混液で、30°Cにて90分間進行させた。このように塩化カリウムを生理的塩濃度が維持されるように添加することによって、HCVのRNAの翻訳がIRESに依存的に成し遂げられる。次いでRNase Aを添加して反応を停止し、2.5 μlの反応混液を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

こうして得られた結果を、図9に示す。図中、縦軸は、pT7-RL-UTR₃₄₁ (b) の活性を100%として、各ベクターによる相対値を%にて表した。これらの結果は、三重の実験を2度繰り返して得られた結果の平均および標準偏差を示している。*印を付したものは、p<0.01にてpT7-RL-UTR₃₄₁ (b) による結果と有意差があることを示す。

この図9から明らかなように、HCV-342を発現増強配列として導入したベクターpT7-RL-UTR₃₄₂ (c) によれば、HCV-341を導入したpT7-RL-UTR₃₄₁ (b) のおよそ4倍の活性が発現していた。そして、pT7-RL-UTR_{341c} (d) によればpT7-RL-UTR₃₄₁の場合とほぼ同等の活性が発現していたので、HC

V-342の第119位における置換は、発現増強に影響を及ぼす変異ではないことが示唆された。一方pT7-RL-UTR_{342A} (e) によれば、pT7-RL-UTR₃₄₂の場合と同等の強い活性が発現されており、従って、配列番号：1で示されるHCV由来の配列の第207位へのチミジンの挿入が、HCV-342による強いIRES依存性の発現活性増強能に寄与していることが推測された。

5 [実施例 10] : トランジェントトランスフェクション

実施例 8 にて調製した各ベクターをトランスフェクトした細胞においても、実施例 9 の *in vitro* 系と同様の発現増強に関する効果が示されるか否かを調べた。

10 Hep G2細胞系は、American Type Culture Collection (ATCC受託番号 HB-8065) より入手したものを、10%胎児牛血清を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (GIBCO社製) で、5%CO₂の湿潤条件下に培養しておいた。このHep G2細胞に、pAM8-1 (Dr. Nakanishi, Osaka Universityより供与) をトランスフェクトすることにより、T7 RNAポリメラーゼを安定に発現している細胞系Hep Tを樹立した。

15 Hep T細胞をトランスフェクションの24時間前に、35 mm径の組織培養用ディッシュに播種して、Hep G2細胞と同様の条件で培養しておいた。各プラスミドDNAを7μgずつトランスフェクションに用い、リン酸カルシウム法 (Profection Mammalian Transfection System, Promega社製) によってトランスフェクションを実施した。トランスフェクションの効率の標準化を目的として、ホタル・ルシフェラーゼを発現するpGL3-Controlベクター (Promega社製) を上記各ベクターと共に、10:1のモル比にて用い、双方をコ・トランスフェクトした。各ベクターのコ・トランスフェクションに対して3つのウェルを用い、この三重の実験を2度繰り返して行った。

トランスフェクトした細胞を48時間培養した後、その細胞溶解液につ

いて、Dual Luciferase Assay Systemで発現したルシフェラーゼ活性を測定した。さらに、共にトランスフェクトしたホタル・ルシフェラーゼをLuciferase Assay Systemで測定し、トランスフェクションの効率を求めて各活性値を補正した。この結果を図10に示す。図中、図9と同様に、縦軸は、pT7-RL-UTR₃₄₁ (b) の活性を100%とした各ベクターによる相対値%で、三重の実験を2度繰り返して得られた数値の平均および標準偏差によって示している。*印を付したものは、p<0.01にてpT7-RL-UTR₃₄₁ (b) による結果と有意差があることを示す。

図10でも、実施例9にて得られたものとほぼ同様の結果が示されている。すなわち、HCV-342を発現増強配列として導入したベクターpT7-RL-UTR₃₄₂ (c) によれば、HCV-341を導入したpT7-RL-UTR₃₄₁ (b) の場合のおよそ6～7倍の活性が発現していた。そして、pT7-RL-UTR_{342A} (e) によれば、pT7-RL-UTR₃₄₂の場合と同等の強い活性が発現されていた。

ベクターpT7-RLがトランスフェクトされた場合 (a) のRluc活性は極めて低く、これはキャップ非依存性の翻訳開始が効率よく行われなかつたことに起因するものと考えられた。しかし、HCV-342の配列およびこの配列の第119位を置換した配列の双方が、*in vitro*翻訳系でも、トランスフェクタント内でも発現を増強できることが明らかになった。

[実施例11] : HCV1b変異株由来の発現増強配列を含むビ・シストロン・ベクターの構築

上記単一シストロン系における結果をさらに例証するための実験用に、実施例8で調製したベクターと同様の発現増強配列を含み、且つ2つのシストロンを有するベクターを調製した。SV40プロモーター、ホタル・ルシフェラーゼ (Fluc) 遺伝子、発現増強配列、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ (Rluc) 遺伝子およびSV40ポリAを含むベクターを、Fluc遺伝子が組み込まれたpGL3 Controlベクター (Promega社製) より構築した (

図 1 1 および 1 2 参照)。

実施例 8 に記載したと同様にPCRによって増幅した各発現増強配列（対照のpGL3Rには含まない：図 1 1 および 1 2 （a））とRlucを、pGL3 ControlベクターのXba I部位に導入した。導入後のベクターは配列決定を行って、正しい方向に各配列が組み込まれたことを確認した。

[実施例 1 2] : トランジェントトランスフェクション

実施例 1 1 で得られたビ・シストロン・ベクターを、実施例 2 におけると同様にCOS1細胞（ATCCより入手、受託番号CRL-1650）へトランスフェクトした。

トランスフェクト体から、先ずDual Luciferase Assay Systemで発現した各ルシフェラーゼ活性値を測定し、さらに、上流のシストロンより発現されるホタル・ルシフェラーゼの活性をLuciferase Assay Systemで測定してトランスフェクションの効率を算定し、上記各活性値を補正した。こうして得られた結果を図 1 3 に示す。図中、図 9 と同様に、縦軸は、pT7-RL-UTR₃₄₁（b）の活性を100%とした各ベクターによる相対値%で、三重の実験を3度繰り返して得られた数値の平均および標準偏差によって示している。*印を付したものは、p<0.05にてpGL3R-UTR₃₄₁（b）による結果と有意差があることを示す。

図 1~3 に示すように、対照のベクターであるpGL3R（a）によれば、下流の第 2 シストロン（Rluc）由来の発現は殆ど認められず、発現増強配列を導入して初めて、その活性が発現していた。そして、HCV-342を発現増強配列として導入したベクターpGL3R-UTR₃₄₂（c）によれば、HCV-341を導入したpGL3R-UTR₃₄₁（b）またはHCV-341の第119位が置換されたpGL3R-UTR_{341c}（d）の場合のおよそ 2 倍の活性が発現していた。そして、pGL3R-UTR_{342A}（e）によれば、pGL3R-UTR₃₄₂の場合と同等の強い活性が発現されており、やはり、第207位へのチミジンの挿入によって発現増強能が高め

られ、第119位の変異は発現増強にあまり影響を及ぼさないことが示唆された。

これらの結果より、HCVの変異株に由来する配列（5'-UTR342）による、IRES活性に基づく特に優れた発現増強の効果は、肝細胞に限らず、効果の強弱は多少あるものの、細胞特異的なものでないことが明らかになった。そして、やはり細胞非特異的に、HCVの野生株の5' 非翻訳領域の第207位へのチミジンの挿入によって発現増強の効果が高められることも確認された。

以上の実施例から、HCV由来の発現増強配列に单一の変異を施すことによって発現増強の効果を格段に高め得ることが示唆される。この効果が示された変異部位、すなわちHCV遺伝子の5' 非翻訳領域の第207位は、ピリミジン領域 (pyrimidine tract) 結合蛋白質 (Ali, N., and Siddiqui, A. ; J. Virol., 69, 6367-6375, 1995) の結合部位であると推定される領域の中に含まれている。ピリミジン領域結合蛋白質は、翻訳因子の1つであると考えられている (Hellen, C. U. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7642-7646, 1993、Witherell, G. W. et al. ; Biochemistry, 32, 8268-8275, 1993、Hellen, C. U. et al. ; J. Virol., 68, 941-950, 1994、およびWitherell, G. W., and Wimmer, E. J. Virol., 68, 3183-3192, 1994) ので、前記部位にヌクレオチドが1つ挿入することで翻訳の開始に必要とされる細胞性の因子とIRESとの相互作用が促進するのかもしれないと考えられる。酵素によるフットプリントイング分析によって、ポリペプチド鎖開始因子eIF3による、野生型HCVのIRES構造の第IIIドメイン上の第204、214、215、216および212位における保護が認められており、eIF3に対するHCVのIRES上の結合領域が、かかるドメインIIIの端部に含まれていることが示唆されている (Sizova, D. V. et al., J. Virol., 72, 4775-4782, 1998)。このeIF3結合領域と想定される部分の中心に、前記変異部位たる第207位が

位置しているので、この部分へのチミジン挿入によってeIF3に対する親和性が変化し、発現増強効果の上昇が起こったのかもしれないと思われるが、この機構の詳細については未だ明確ではない。既知の5'-UTR341に比較して、新規の5'-UTR342が高いIRES活性の増強能を有するのは、①ピリミジンリッチ領域の近傍に変異がある、②トランス因子の結合部位に変異がある、もしくは③BoxAおよびBoxBの近傍に変異がある等に起因すると考えられ、それ故にリボソームの結合が増強した結果であると思われる。

また、5' 非翻訳領域に変異が認められた新規HCV臨床分離株（配列番号：7）は、高ウィルス血症の患者より単離されたため、5'-UTR342がウィルスの複製を活発にしていることが示唆される。ゆえに、207位にチミジンが挿入された5'-UTR342を特異的に検出することにより、感染したHCVの特徴を知ることもできる。

上記実施例2～6に示すように、COS 1 およびHepG 2 等の真核細胞において、真核細胞のRNAポリメラーゼに親和性を有するSV40、HSV TKおよびCMVプロモーターを用いてルシフェラーゼ発現増強実験を行った結果、発現環境・発現方法等が異なっても、本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列を用いることにより、ルシフェラーゼ発現を増強させることができた。これら真核細胞の翻訳はキャップ依存的な翻訳過程であり、かつIRES非依存的な翻訳過程であることが判っている。依って、実施例2～6に示す様な実験はIRES活性に依存しない翻訳過程の実験系であるといえる。すなわち、本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列は、その作用原因として、IRES活性非依存的な翻訳増強因子として機能しているものと考えられる。従って、IRES活性に依存しない翻訳過程の実験系において、HCVの5'-UTR341が有用遺伝子の発現を増強することが本発明により初めて証明されたのである。

一方、実施例 9 に示すように、IRES活性に依存した翻訳過程の実験系であるウサギ網状赤血球抽出液を用いた in vitro 翻訳において、5' -UTR 342は5' -UTR341に比較してIRES活性を大幅に増強することにより、有用遺伝子発現を増強させることができた。さらに、実施例 10 ～ 12 に示すように、原核細胞のRNAポリメラーゼに親和性を有するT7プロモーターを用いてルシフェラーゼ発現増強実験を行った結果、T7 RNAポリメラーゼをHepG2細胞に導入し形質転換したHepT細胞の細胞質中であってもルシフェラーゼの発現を増強させることができた。また、ビシストロニックの系でSV40プロモーターを用い、T抗原発現COS細胞にてルシフェラーゼ発現増強実験を行ったところ、ルシフェラーゼ発現が増強した。これら実施例 9 ～ 12 に示したような、IRES活性に依存した翻訳過程の実験系においてルシフェラーゼ発現を増強させるということは、5' -UTR342が作用原因として5' UTR-341が有するIRES活性の増強もしくはmRNAの安定性の向上のいずれかに働いているものと考えられる。本発明者らは、HCVの5' -UTR342に関してはmRNAの安定性の向上に起因するのではないことを、Primer Extens Assay (J. Virology, 72, 8789-8796, 1998参照) によって証明している。いずれにしても、IRES活性に依存した翻訳過程の実験系において、HCVの5' -UTR342を用いることにより5' -UTR341に比較して有用遺伝子の発現を増強することができる。現在までに、HCVの5' 非翻訳領域においてIRES活性に依存した翻訳過程の実験系により、5' -UTR341がIRES活性を有することが報告されている (Virology, 226, 47-56, 1996, J. Virology, 72, 8789-8796, 1998参照)。しかしながら、本発明により初めて、本発明のHCV由来の新規5' -UTR342配列がこれまで報告されている5' -UTR341の有するIRES活性に比較して強力にIRES活性を増強させ、有用遺伝子の発現を増強させることができることが判明したのである。

実施例 9 ～ 12 の様なモノシストロニックあるいはビシストロニック

な系でT7プロモーターの下流にHCVの5' 非翻訳領域を連結させ、該下流に有用遺伝子を組込み、有用遺伝子（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）を発現させることができるとする報告は、すでに存在している (Virology, 226, 47-56, 1996, J. Virology, 72, 8789-8796, 1998)。しかしながら、これらの実験はいずれも、HCVの5' -UTR341を用いて実施例10～12に示すごとくT7 RNAポリメラーゼを発現するように予め宿主を形質転換した哺乳細胞を用いているため、IRESに依存した翻訳過程の実験系によるものである。すなわち、HCVの5' -UTR341にIRES活性が存在することは証明されているが、IRES活性に依存しない翻訳過程の実験系により証明される、翻訳増強因子としての機能は全く示されていない。しかるに、本発明の実施例2～6によって初めて、翻訳増強因子の機能が証明されたのである。また、HCV由来の新規5' -UTR342が、IRES活性に依存した翻訳過程の実験系において既知の5' -UTR341に比較してIRES活性をより増強させることによって有用遺伝子の発現を増強させることができることも、本発明によって初めて証明されたのである。

[産業上の利用可能性]

本発明によって発現ベクターの種類、これに含まれるプロモーターやシグナル、エンハンサー等の配列、有用遺伝子の種類や起源、宿主細胞種の如何に関わらず、in vivoおよびin vitroでの遺伝子の発現を増強して遺伝子産物の生産量を増加させることができるという効果がもたらされる。

また、導入する配列に特定の変異を施して、遺伝子発現を増強させる能力をさらに高めることが可能である。

これらの効果は、細胞培養系においてペプチド産生量を増加させる目

的に利用され得るだけでなく、従来、臓器や腫瘍などに特異的であるがその活性が弱いために実用化が難しかったプロモーターと組み合わせることによって、効果的な遺伝子治療用のベクターへの応用にも利用することができる。

5 さらに、通常のIRES活性よりも優れたIRES活性を有する配列を含むプローブを用いて、IRESとの相互作用性を有する物質（モジュレーター等）や、IRES依存性の翻訳開始因子をスクリーニングすることが可能になる。

10 また、本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列を生体内に導入することによってmRNA翻訳を促進させて、生体内でのキャップ依存的mRNA翻訳の低下に起因する疾患を治療することもできる。

あるいは、生体内でのIRES活性の低下に起因する疾患を治療するため有用遺伝子発現増強核酸配列を生体内に導入することによって、mRNA翻訳を促進させることも可能となる。

15 さらには、被験者由来の生体試料中に含まれるHCV由来の特定のポリヌクレオチド配列の存在を検出し、この配列の存在に基づいてC型肝炎の重症度を診断することができる。

請求の範囲

1. 有用遺伝子の発現増強のために、遺伝子発現ベクターに組み込まれる有用遺伝子発現増強核酸配列であって、

5 ウィルス遺伝子の5' 非翻訳領域もしくはその断片またはその変異体が有する核酸配列を含む有用遺伝子発現増強核酸配列。

2. 前記5' 非翻訳領域が、少なくとも 1 つのピリミジンリッチ領域を含む請求の範囲第 1 項記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

10 3. 前記5' 非翻訳領域が、BoxA、BoxB、トランス因子結合部位およびこれらの組合せよりなる群から選択される領域に該当する配列を含む請求の範囲第 1 または 2 項に記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

4. 前記5' 非翻訳領域が、AUGまたはATGの配列をさらに含む請求の範囲第 1 乃至 3 項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

15 5. 前記5' 非翻訳領域が、ウィルスのmRNAのIRES領域の一部または全体を含む請求の範囲第 1 乃至 4 項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

20 6. 前記有用遺伝子発現増強核酸配列が、前記核酸配列に加えてウィルス遺伝子の5' 非翻訳領域に隣接する翻訳領域の一部またはその変異体をさらに含む請求の範囲第 1 乃至 5 項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

7. 前記有用遺伝子発現増強核酸配列が、遺伝子発現ベクターにおいて発現制御プロモーター配列の下流、且つ有用遺伝子の配列の上流に組み込まれる請求の範囲第 1 乃至 6 項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

25 8. 前記核酸配列がcDNA配列である請求の範囲第 1 乃至 7 項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

9. 前記遺伝子発現ベクターが、真核細胞における発現用ベクターである請求の範囲第1乃至8項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

10. 前記ウイルスが、RNAウイルスである請求の範囲第1乃至9項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。
5

11. 前記ウイルスが、ビコルナウイルスである請求の範囲第10項記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

12. 前記ウイルスが、HCVウイルスである請求の範囲第10項記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

10 13. 前記ウイルスがHCVウイルスであり、前記有用遺伝子発現増強核酸配列が、前記核酸配列に加えてHCVウイルスのコア蛋白質翻訳領域の一部またはその変異体をさらに含む請求の範囲第10項記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

14. 前記核酸配列が、以下のヌクレオチド配列すなわち、

15 gccagcccccc tgatggggc gacactccac catagatcac tccccgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagttacaccg gaattgccag 180

(配列番号：1、ヌクレオチド第1～180位) からなる請求の範囲第12記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

20 15. 前記核酸配列が、以下のヌクレオチド配列すなわち、

gacgaccggg tccttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttg gggtgcccc 60
gcgagactgc tagccgagta gtgtgggtc gcgaaaggcc ttgtggtaact gcctgatagg 120
gtgcttgcga gtccccggg aggtctcgta gaccgtgcac c 161

(配列番号：1、ヌクレオチド第181～341位) からなる請求の範囲第12項記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

16. 前記核酸配列が、以下のヌクレオチド配列すなわち、

gccagcccccc tcatgggggc gacactccac catagatcac tccctgtga ggaactactg 60
 tttcacgca gaaagcgct agccatggcg ttatgttag tgctgtgcag cctccaggac 120
 cccccctccc gggagagcca tagtggtctg cgaaaccggt gagtacaccg gaattgccag 180
 gacgaccggg tccttccttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 5 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtaact gcctgatagg 300
 gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac c 341

(配列番号：1、ヌクレオチド第1～341位) からなる請求の範囲第1 2記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

17. 前記核酸配列が、以下のヌクレオチド配列すなわち、

10 gacgaccggg tccttccttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 60
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtaact gcctgatagg 120
 gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcaca aatcctaaac 180
 ctcaaagaaa aaccaaactgt aacaccaacc gccgcccaca ggacgtcaag ttcccgccg 240
 gtggtcagat cgttggtgga gttacctgt tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc 300
 15 gcgacttag gaagacttcc gagcggtcgc aacctcggt aaggcgacaa cctatcccc 360
 aggctcgccg gcccggggc aggacctggg ctcagcccg gtatccttg cccctctatg 420
 gcaacgaggg catgggttgg gcaggatggc tcctgtcgcc ccggcgctcc cggcctagtt 480
 gggcccttc ggaccccccgg cgtaggtcgc gtaatttggg taaggtcatc gat 533

(配列番号：1、ヌクレオチド第181～713位) からなる請求の範囲第1 3記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

18. 前記核酸配列が、以下のヌクレオチド配列すなわち、

gccagcccccc tcatgggggc gacactccac catagatcac tccctgtga ggaactactg 60
 tttcacgca gaaagcgct agccatggcg ttatgttag tgctgtgcag cctccaggac 120
 cccccctccc gggagagcca tagtggtctg cgaaaccggt gagtacaccg gaattgccag 180
 25 gacgaccggg tccttccttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtaact gcctgatagg 300

gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcaca aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacc gccgcccaca ggacgtcaag ttcccgggcg 420
gtggtcagat cgttggtgga gtttacctgt tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc 480
gcgcgacttag gaagacttcc gagcggtcgc aacctcgtag aaggcgacaa cctatcccc 540
5 aggctcgccg gcccggaggc aggacctggg ctcagcccg gtatccttgg cccctctatg 600
gcaacgaggg catgggttgg gcaggatggc tcctgtcgcc ccgcggctcc cggcctagtt 660
ggggcccttc ggaccccccgg cgtaggtcgc gtaatttggg taaggtcatc gat 713

(配列番号：1) からなる請求の範囲第13項記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

10 19. 前記核酸配列において、5' 非翻訳領域に含まれるピリミジンリッチ領域、BoxA、BoxB、および／またはトランス因子結合部位に該当する配列のうち、少なくとも1箇所の配列の内部または近傍に、野生型ウイルス由来の配列の1個または数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入および／または付加された配列を含んでいる請求の範囲第3乃至18項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

15 20. 前記核酸配列において、5' 非翻訳領域の以外の領域に該当する配列に、野生型ウイルス由来の配列の1個または数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入および／または付加された配列を含んでいる請求の範囲第1乃至19項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

20 21. 前記核酸配列において、配列番号：1のヌクレオチドの第207位にチミジンが挿入された請求の範囲第15、16、17または18項記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

25 22. 前記有用遺伝子発現増強核酸が、翻訳増強活性を有することにより有用遺伝子の発現を増強する請求の範囲第1乃至21項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

23. 前記有用遺伝子発現増強核酸配列が、IRES活性を増強することに

より有用遺伝子の発現を増強する請求の範囲第1乃至22項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

24. 以下のヌクレオチド配列すなわち、

5	gccagcccccc tcatgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg	60
	tcttcacgca gaaagcgctc agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggcc	120
	ccccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccgggt gagttacaccg gaatttgccag	180
	gacgaccggg tcctttcttg gatcaatccc gctcaatgcc tggagatttg ggcgtgcccc	240
	cgcgagactg ctagccgagt agtgttgggt cgcgaaaggc ctttgtggtac tgcctgatag	300
	ggtgcttgcg agtgccccgg gaggtctcgta agaccgtgca cc	342

10 (配列番号：7) を含み、IRES依存的にmRNA翻訳を増強することにより有用遺伝子の発現を増強させることを特徴とする有用遺伝子発現増強核酸配列。

25. 以下のヌクレオチド配列すなわち、

15	gccagcccccc tcatgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg	60
	tcttcacgca gaaagcgctc agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggcc	120
	ccccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccgggt gagttacaccg gaatttgccag	180
	gacgaccggg tcctttcttg gatcaatccc gctcaatgcc tggagatttg ggcgtgcccc	240
	cgcgagactg ctagccgagt agtgttgggt cgcgaaaggc ctttgtggtac tgcctgatag	300
	ggtgcttgcg agtgccccgg gaggtctcgta agaccgtgca cc	342

20 (配列番号：7) で示される核酸配列が有するIRES活性と同等のIRES活性を有し、該配列の断片または変異体からなるポリヌクレオチドを含み、且つIRES依存的にmRNA翻訳を増強することにより有用遺伝子の発現を増強させることを特徴とする有用遺伝子発現増強核酸配列。

26. 以下のヌクレオチド配列すなわち、

25	gccagcccccc tcatgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg	60
	tcttcacgca gaaagcgctc agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggcc	120

ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccgg gagtacaccg gaattgccag 180
gacgaccggg tccttcttg gatcaatccc gctcaatgcc tggagatttgc ggcgtgcccc 240
cgcgagactg ctagccgagt agtgttgggt cgcgaaaggc cttgtggtac tgccctgatag 300
ggtgcttgcg agtgccccgg gaggtctcgt agaccgtgca cc 342

5 (配列番号：7) からなる単離されたポリヌクレオチド。

27. 以下のヌクレオチド配列すなわち、

gccagcccc tcatggggc gacactccac catagatcac tccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggcc 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccgg gagtacaccg gaattgccag 180
10 gacgaccggg tccttcttg gatcaatccc gctcaatgcc tggagatttgc ggcgtgcccc 240
cgcgagactg ctagccgagt agtgttgggt cgcgaaaggc cttgtggtac tgccctgatag 300
ggtgcttgcg agtgccccgg gaggtctcgt agaccgtgca cc 342

(配列番号：7) で示される核酸配列が有するIRES活性と同等のIRES活性を有し、該配列の断片または変異体からなる単離されたポリヌクレオチド。

28. 請求の範囲第1乃至25項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列を含む遺伝子発現用ベクター。

29. 請求の範囲第28項記載のベクターで形質転換またはトランسفエクトされた宿主細胞。

20 30. 請求の範囲第28項記載のベクターを用いて有用遺伝子産物を発現させる方法。

31. 請求の範囲第29項記載の宿主細胞を培地中で生育させ、該細胞および／または生育培地から有用遺伝子産物を単離する工程を含む、有用遺伝子産物の製造方法。

25 32. 請求の範囲第28項記載のベクターを用いて、有用遺伝子の発現を増強する方法。

3 3 . 請求の範囲第 2 6 または 2 7 項に記載のポリヌクレオチドを含む、IRESとの相互作用性を有する物質をスクリーニングするためのプローブ。

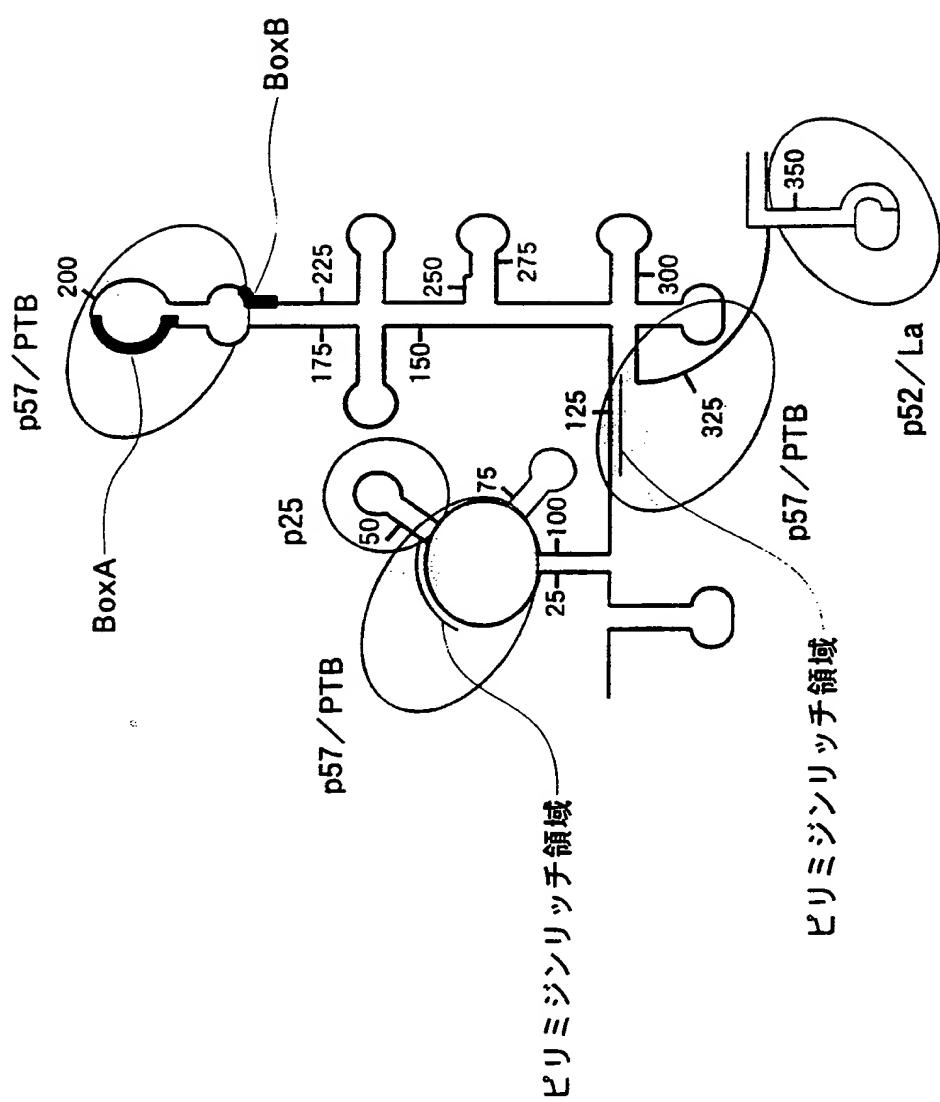
5 3 4 . 請求の範囲第 2 6 または 2 7 項に記載のポリヌクレオチドを含む、IRES依存性の翻訳開始因子をスクリーニングするためのプローブ。

10 3 5 . 生体内でのキャップ依存的mRNA翻訳の低下に起因する疾患を治療するために、請求の範囲第 1 乃至 2 5 項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列を生体内に導入することによってmRNA翻訳を促進することができるよう、該有用遺伝子発現増強核酸配列を含むこと特徴とする治療用組成物。

3 6 . 生体内でのIRES活性の低下に起因する疾患を治療するために、請求の範囲第 2 4 または 2 5 項に記載の有用遺伝子発現増強核酸配列を生体内に導入することによってmRNA翻訳を促進することができるよう、該有用遺伝子発現増強核酸配列を含むこと特徴とする治療用組成物。

15 3 7 . C型肝炎の重症度診断方法であって、請求の範囲第 2 6 または 2 7 項に記載のポリヌクレオチドを標的として、被験者由来の生体試料中に含まれる該ポリヌクレオチド配列の存在を検出し、この配列の存在に基づいてC型肝炎の重症度を診断することを特徴とする方法。

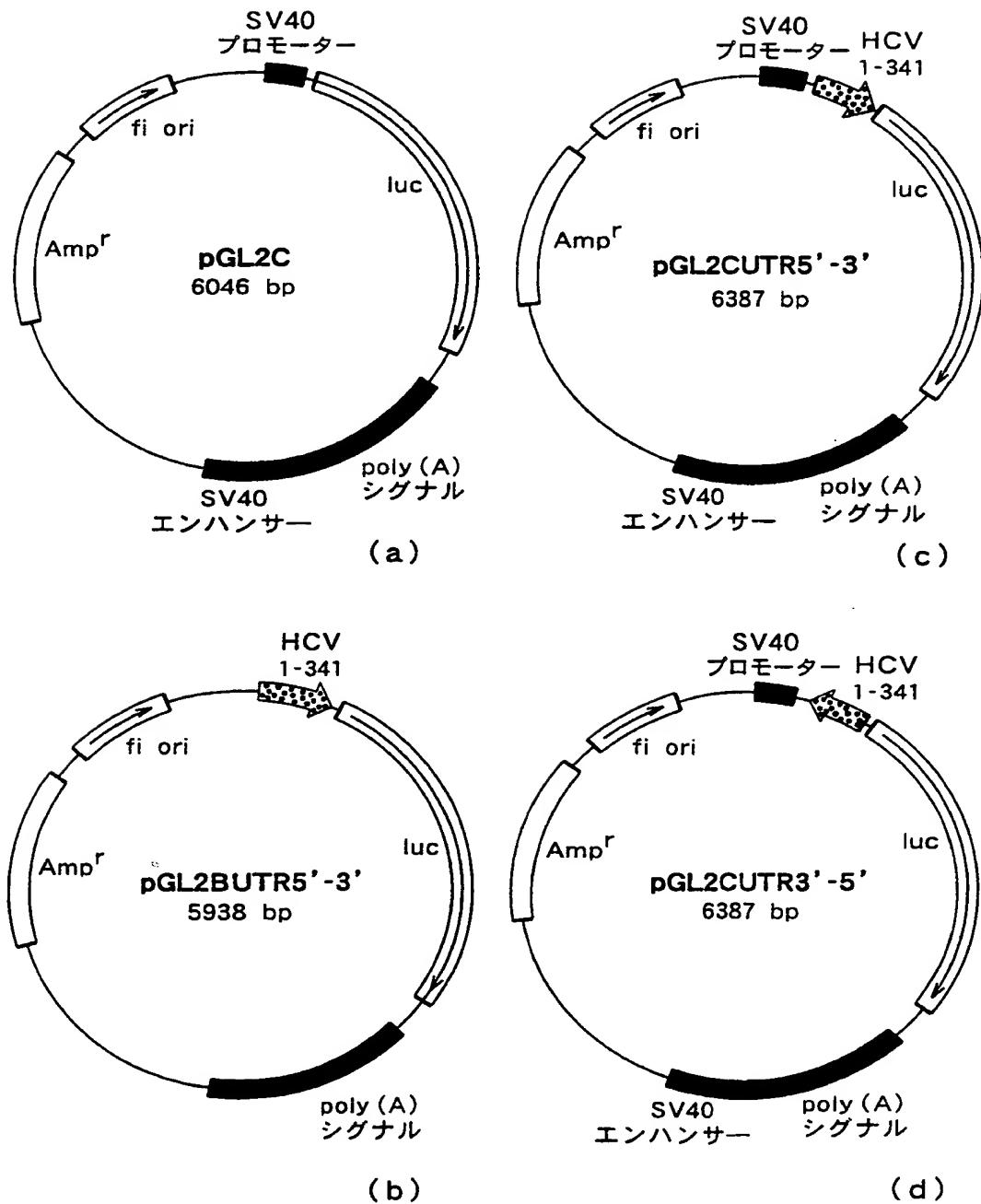
第1図

1
13

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 2 図

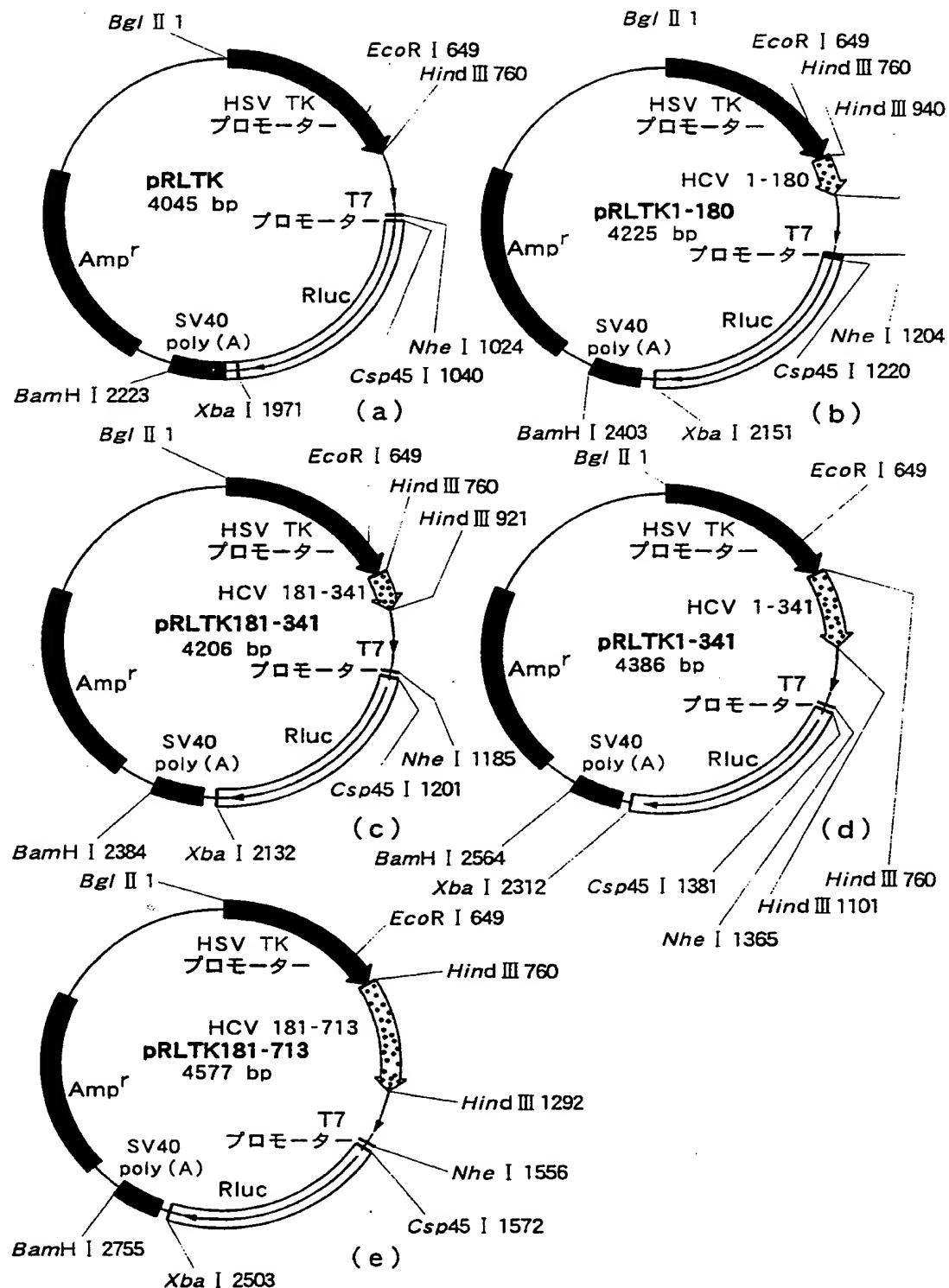
2 / 13



THIS PAGE BLANK (USPTO)

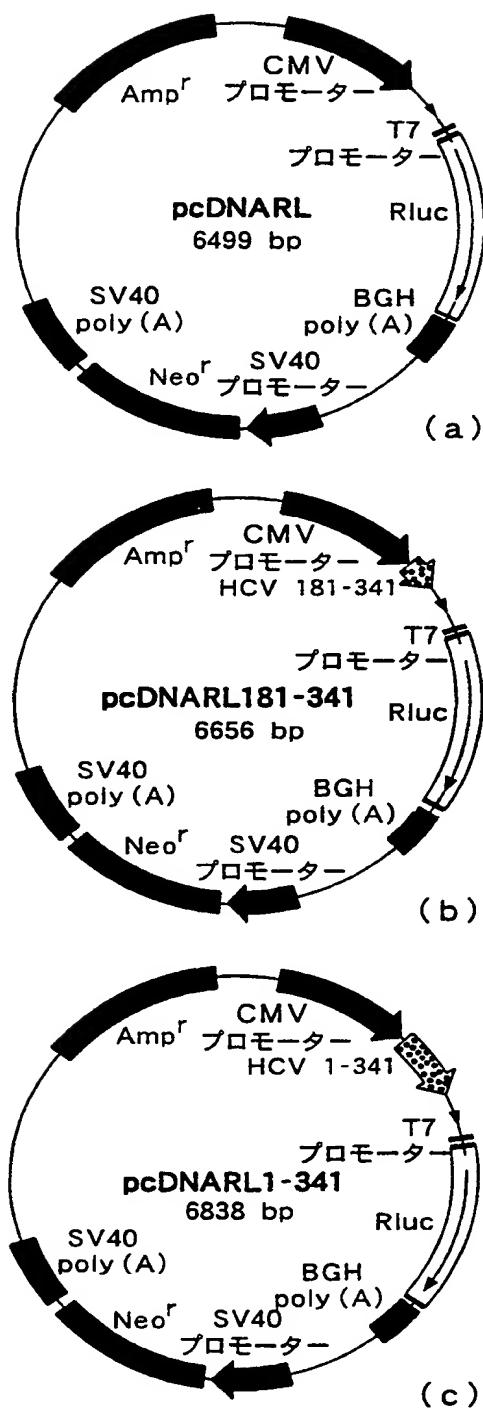
第3図

3 / 13



THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 4 図

4 /
13

THIS PAGE IS BLANK (USPTO)

第 5 図

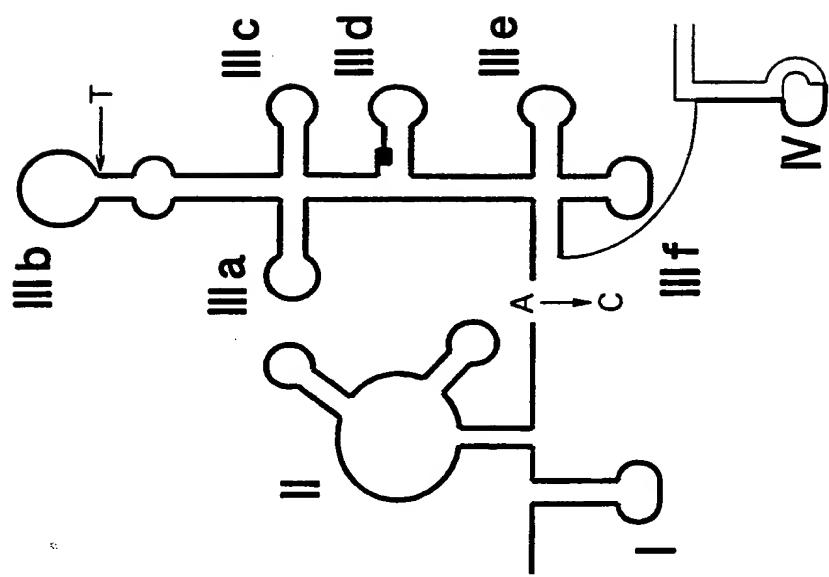
5 / 13

5' -UTR₃₄₁ GCCAGCCCCC TGATGGGGGC GACACTCCAC CATAGATCAC TCCCCTGTGA 505' -UTR₃₄₂ GCCAGCCCCC TGATGGGGGC GACACTCCAC CATAGATCAC TCCCCTGTGA 505' -UTR₃₄₁ GGAACTACTG TCTTCACGCA GAAAGCGTCT AGCCATGGCG TTAGTATGAG 1005' -UTR₃₄₂ GGAACTACTG TCTTCACGCA GAAAGCGTCT AGCCATGGCG TTAGTATGAG 1005' -UTR₃₄₁ TGTCGTGCAG CCTCCAGG_AC CCCCCCTCCC GGGAGAGCCA TAGTGGTCTG 1505' -UTR₃₄₂ TGTCGTGCAG CCTCCAGG_GC CCCCCCTCCC GGGAGAGCCA TAGTGGTCTG 1505' -UTR₃₄₁ CGGAACCGGT GAGTACACCG GAATTGCCAG GACGACCGGG TCCTTCTTG 2005' -UTR₃₄₂ CGGAACCGGT GAGTACACCG GAATTGCCAG GACGACCGGG TCCTTCTTG 2005' -UTR₃₄₁ GATCAA_TCCC GCTCAATGCC TGGAGATTG GGCGTGCCCC CGCGAGACTG 2495' -UTR₃₄₂ GATCAA_TCCC GCTCAATGCC TGGAGATTG GGCGTGCCCC CGCGAGACTG 2505' -UTR₃₄₁ CTAGCCGAGT AGTGTGGGT CGCGAAAGGC CTTGTGGTAC TGCCTGATAG 2995' -UTR₃₄₂ CTAGCCGAGT AGTGTGGGT CGCGAAAGGC CTTGTGGTAC TGCCTGATAG 3005' -UTR₃₄₁ GGTGCTTGC_G AGTCCCCGG GAGGTCTCGT AGACCGTGCA CC 3415' -UTR₃₄₂ GGTGCTTGC_G AGTCCCCGG GAGGTCTCGT AGACCGTGCA CC 342

THIS PAGE BLANK (reverse)

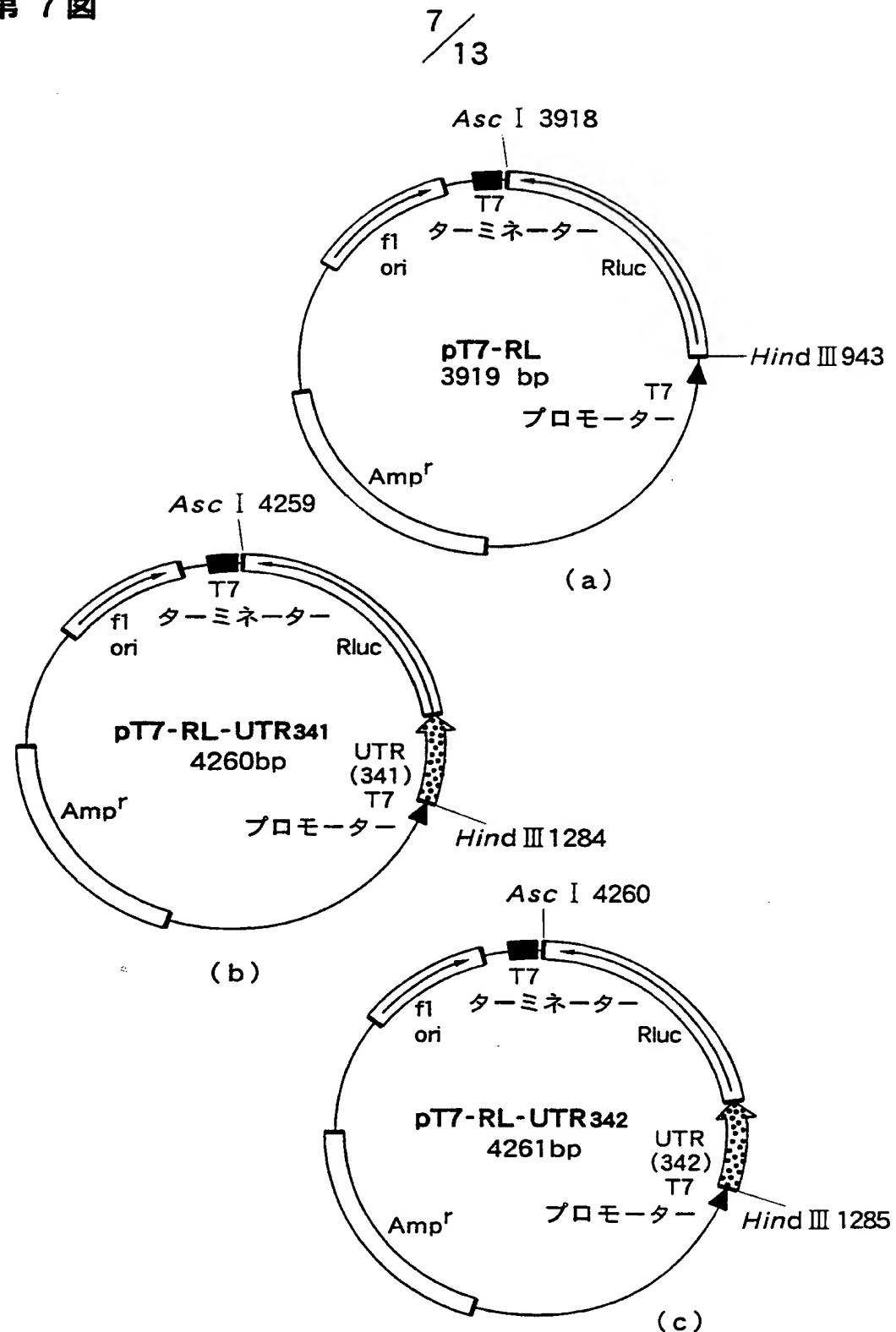
第 6 図

6 / 13



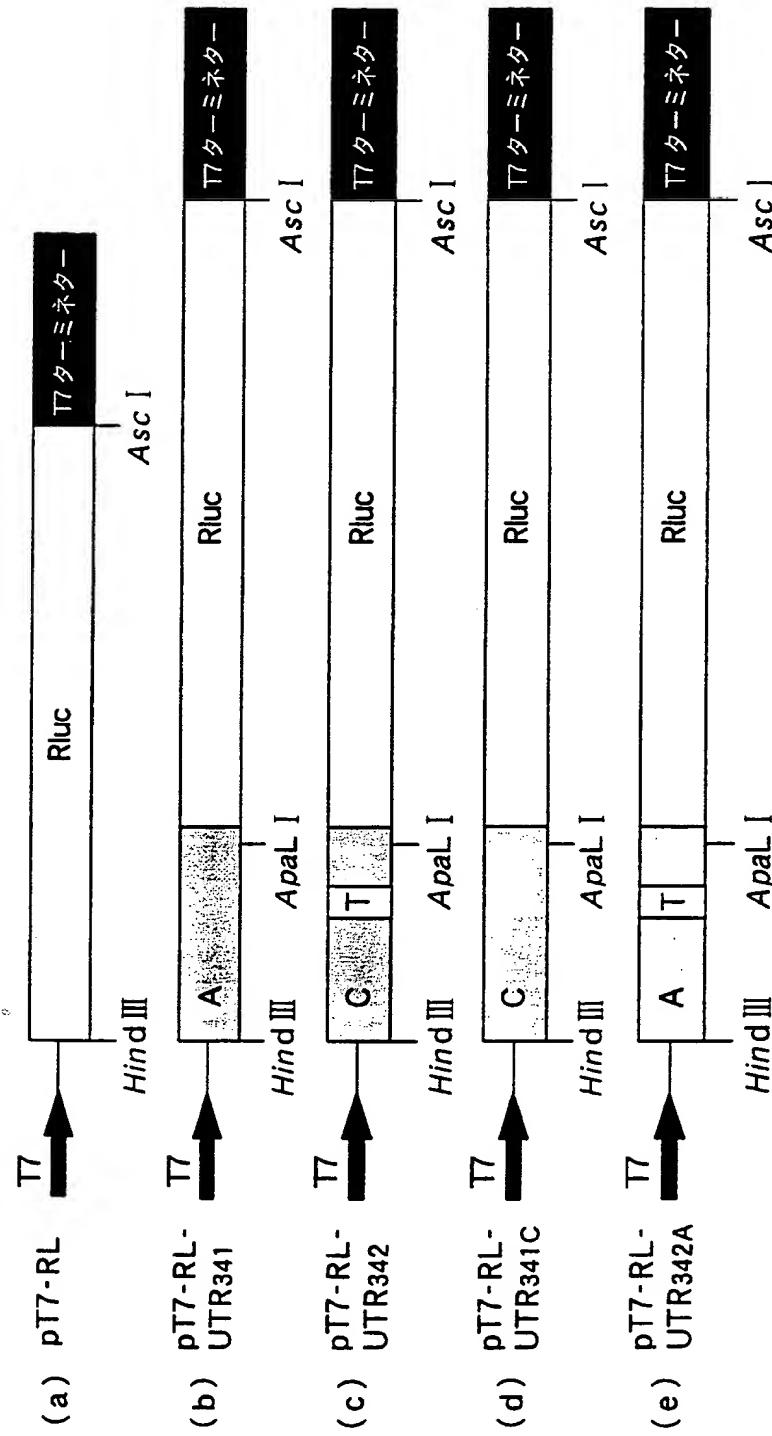
THIS PAGE BLANK "160701"

第 7 図



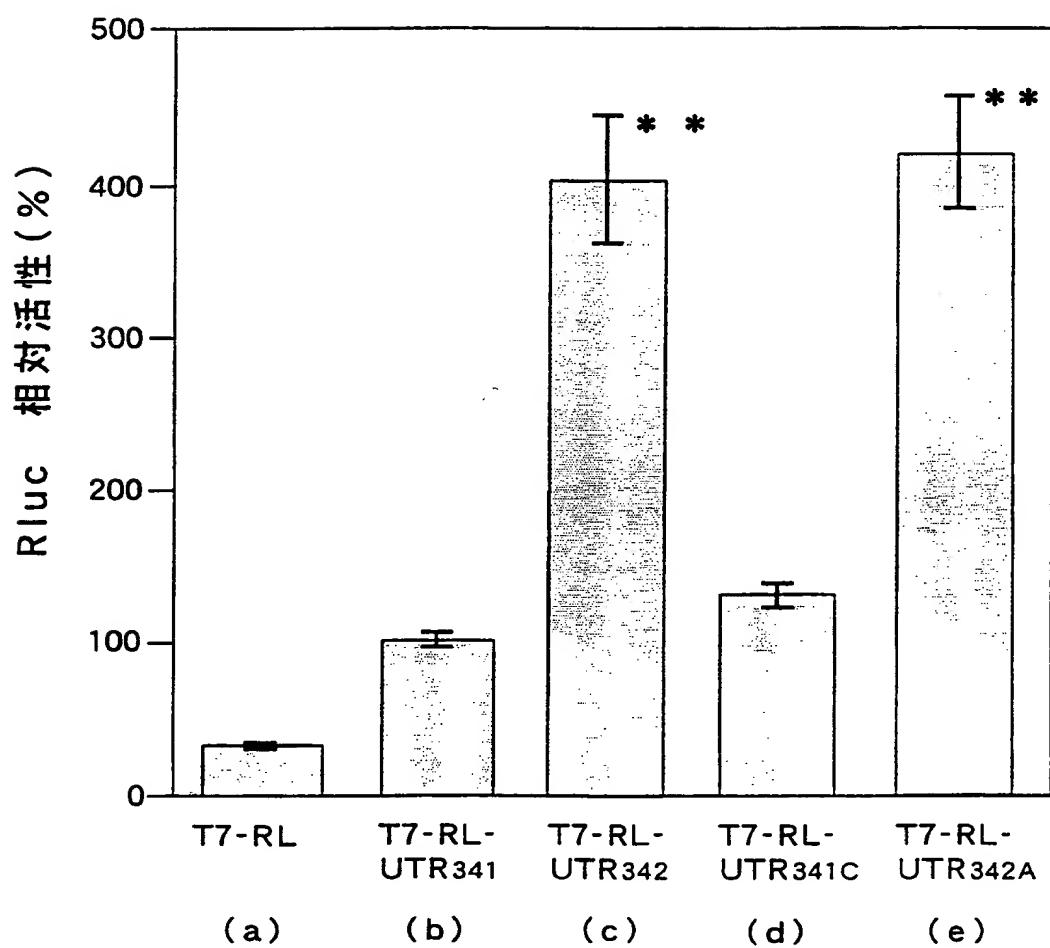
THIS PAGE BLANK (USPTO)

概要図

8
13

THIS PAGE BLANK (USPTO)

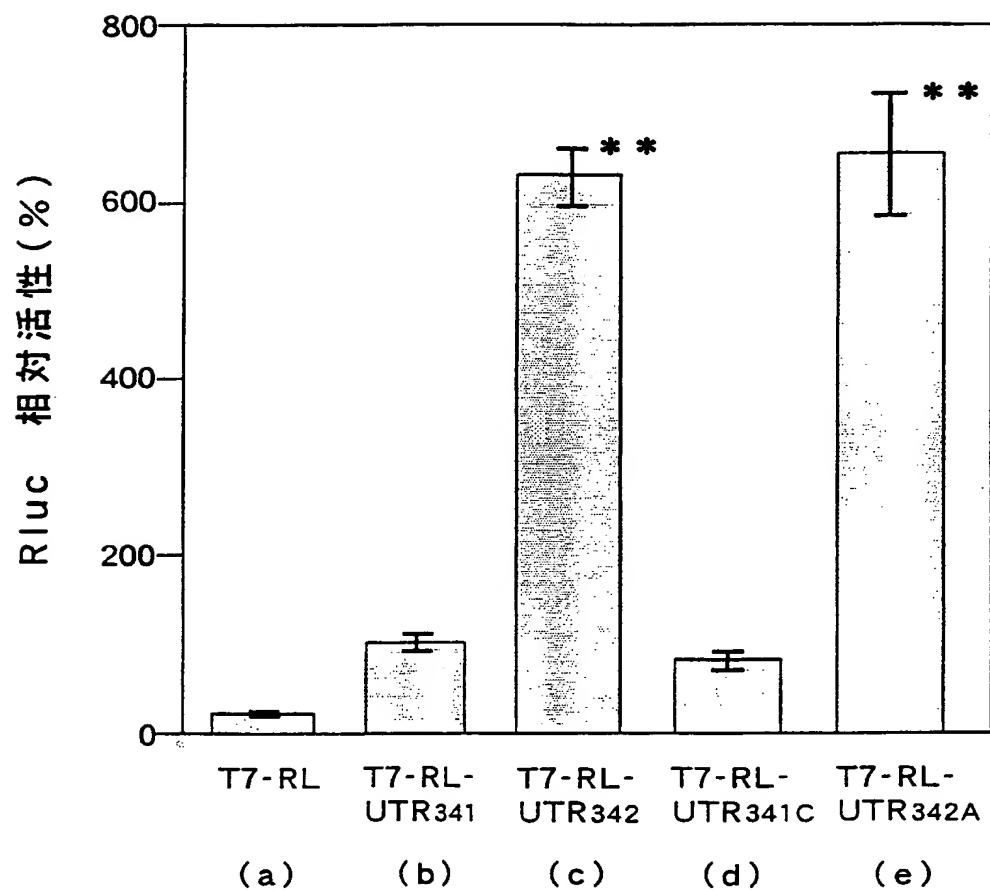
第 9 図

9
/ 13

THIS PAGE IS BLANK (USPTO)

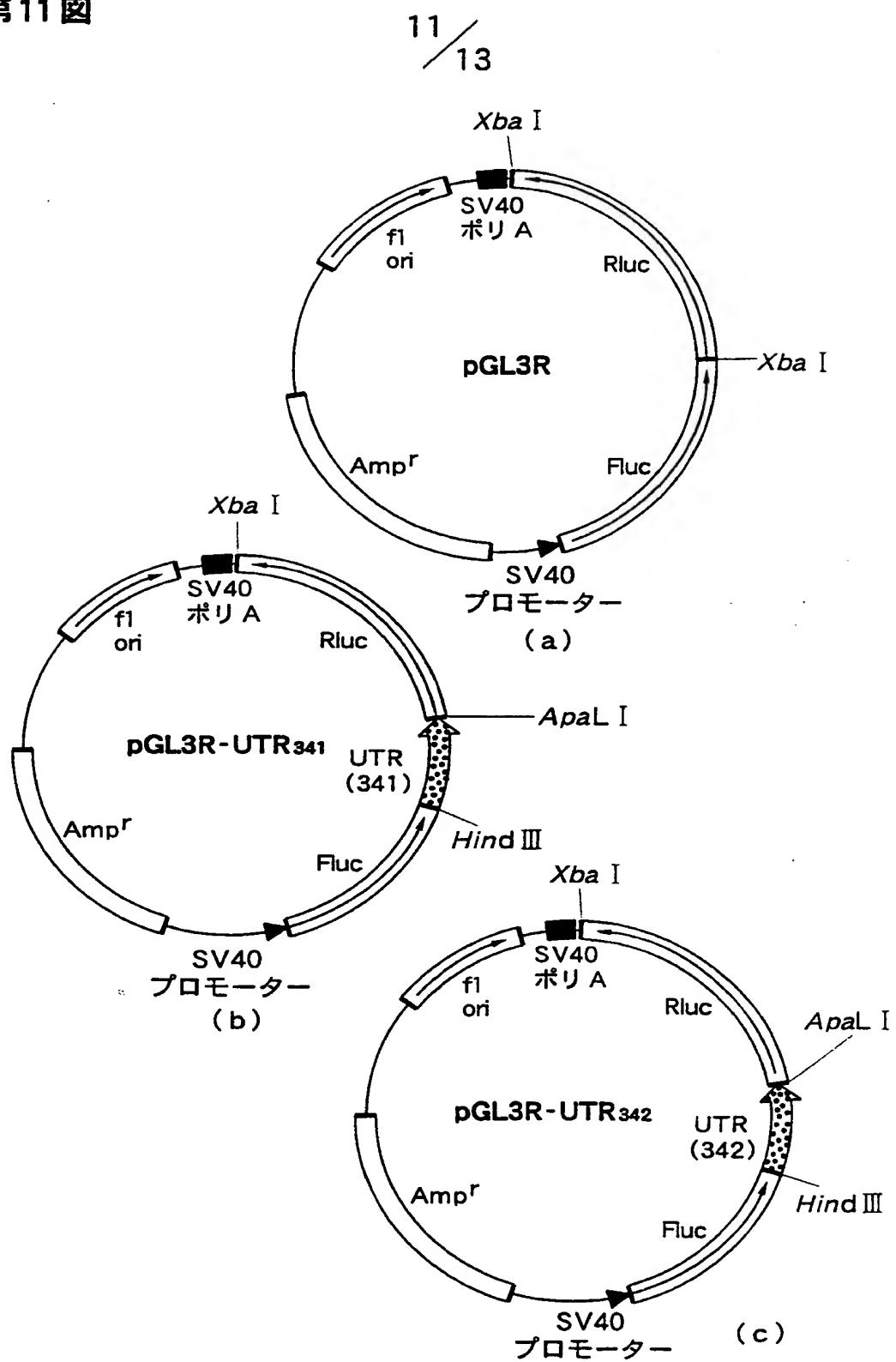
第10図

10 / 13



THIS PAGE IS ANNUAL

第11図

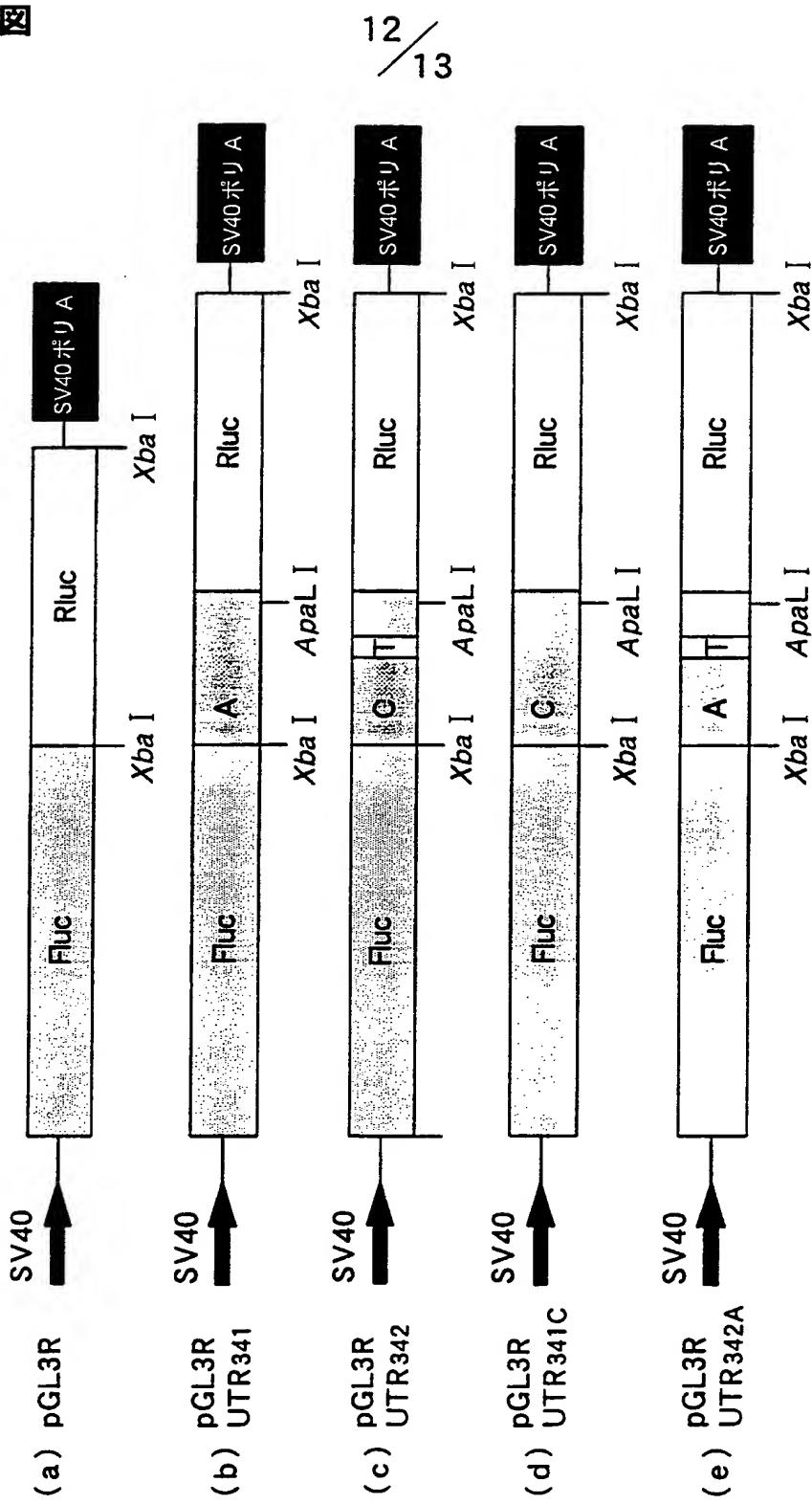


THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

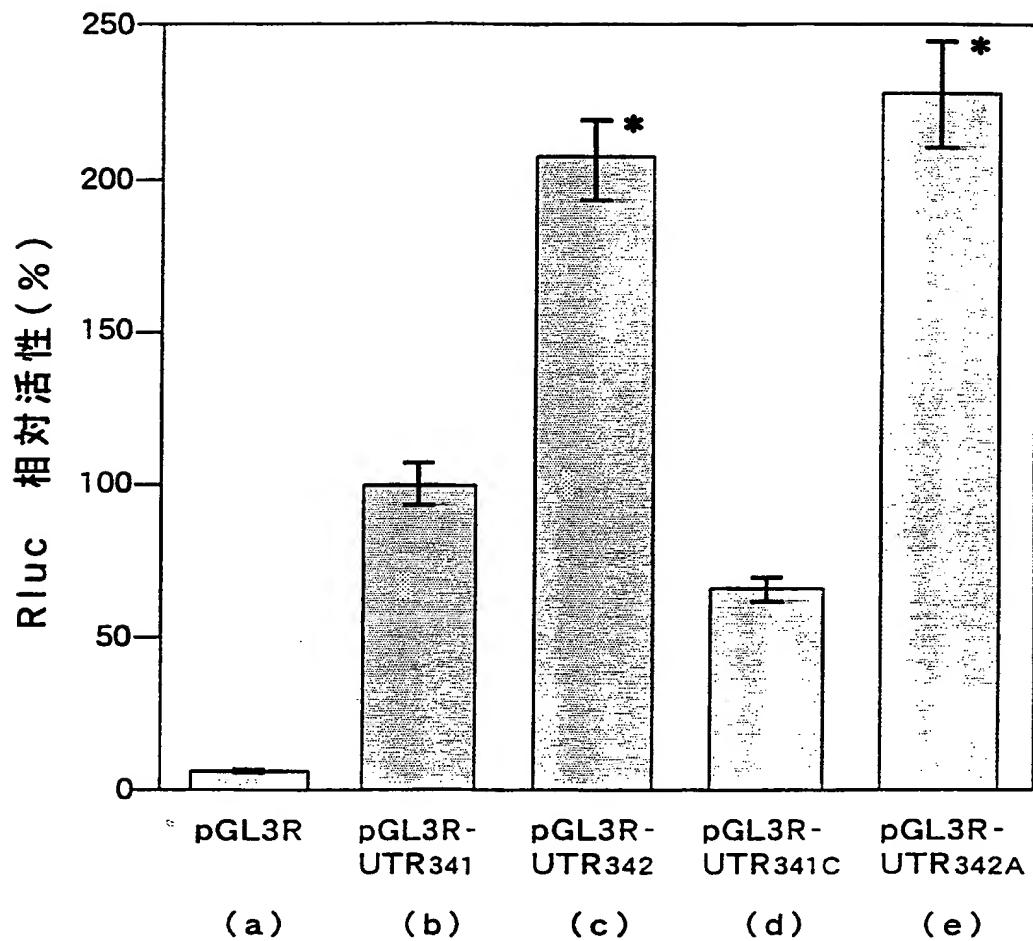
THIS PAGE BLANK (USPTO)

第12図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

第13図

13
/ 13

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENCE LISTING

<110> FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

<120> Nucleic Acid Sequence which Enhances Gene Expression and Method of
Enhancing Gene Expression

<130> 99P137W0

<160> 11

<210> 1

<211> 713

<212> DNA

<213> Hepatitis Type C Virus (HCV)

<220>

<221> 5' UTR

<222> (1)..(341)

<220>

<221> CDS

<222> (342)..(713)

<400> 1

gccagccccc tgatggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 7

tcttcacgca	gaaagcgtct	agccatggcg	ttagtatgag	tgtcggtcag	cctccaggac	120
ccccccccc	gggagagcca	tagtggtctg	cggaaccggt	gagtacaccg	gaattgccag	180
gacgaccggg	tcctttcttg	gatcaacccg	ctcaatgcct	ggagatttgg	gcgtgcccc	240
gcgagactgc	tagccgagta	gtgttggtc	gcaaaggcc	tttgttact	gcctgatagg	300
gtgcttgcga	gtgccccggg	aggtctcgta	gaccgtgcac	c atg agc aca aat cct		356
Met Ser Thr Asn Pro						
			1		5	
aaa cct caa aga aaa acc	aaa cgt aac acc	aac cgc cgc	cca cag gac			404
Lys Pro Gln Arg Lys Thr	Lys Arg Asn Thr	Asn Arg Arg	Pro Gln Asp			
10	15		20			
gtc aag ttc ccg ggc ggt	ggt cag atc gtt	ggt gga gtt	tac ctg ttg			452
Val Lys Phe Pro Gly	Gly Gly Gln Ile	Val Gly Gly	Val Tyr Leu			
25	30		35			
ccg cgc agg ggc ccc agg	ttg ggt gtg cgc	gct act agg aag	act tcc			500
Pro Arg Arg Gly Pro Arg	Leu Gly Val Arg	Ala Thr Arg	Lys Thr Ser			
40	45		50			
gag cgg tcg caa cct cgt	gga agg cga caa	cct atc ccc aag	gct cgc			548
Glu Arg Ser Gln Pro Arg	Gly Arg Arg Gln	Pro Ile Pro	Lys Ala Arg			
55	60		65			
cgg ccc gag ggc agg acc	tgg gct cag ccc	ggg tat cct tgg	ccc ctc			596
Arg Pro Glu Gly Arg Thr	Trp Ala Gln Pro	Gly Tyr Pro	Trp Pro Leu			
70	75	80	85			
tat ggc aac gag ggc atg	ggg tgg gca gga	tgg ctc ctg	tcg ccc cgc			644
Tyr Gly Asn Glu Gly Met	Gly Trp Ala Gly	Trp Leu Leu	Ser Pro Arg			
90	95		100			
ggc tcc cgg cct agt	tgg ggc cct tcg	gac ccc cgg	cgt agg tcg	cgt		692

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 7

Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Ser Asp Pro Arg Arg Arg Ser Arg

105

110

115

aat ttg ggt aag gtc atc gat 713

Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp

120

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Hepatitis Type C Virus (HCV)

<220>

<223> Nucleotide Sequence of PCR Primer for Amplifying Fragments of HCV
cDNA

<400> 2

cccaagcttgc ctagccccct gatggggcg a 31

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Hepatitis Type C Virus (HCV)

<220>

<223> Nucleotide Sequence of PCR Primer for Amplifying Fragments of HCV
cDNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 3

cccaagcttc tggcaattcc ggtgtactca c 31

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Hepatitis Type C Virus (HCV)

<220>

<223> Nucleotide Sequence of PCR Primer for Amplifying Fragments of HCV
cDNA

<400> 4

cccaagcttg acgaccgggt cctttcttg 29

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Hepatitis Type C Virus (HCV)

<220>

<223> Nucleotide Sequence of PCR Primer for Amplifying Fragments of HCV
cDNA

<400> 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cccaagcttg gtgcacggtc tacgagacct

30

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Hepatitis Type C Virus (HCV)

<220>

<223> Nucleotide Sequence of PCR Primer for Amplifying Fragments of HCV
cDNA

<400> 6

cccaagctta tcgatgacct taccca

26

<210> 7

<211> 342

<212> DNA

<213> Mutated Hepatitis Type C1b Virus (HCV)

<220>

<221> 5' UTR

<222> (1)..(342)

<400> 7

gccagcccccc tcatgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtagcag cctccaggcc 120

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ccccctccc gggagagcca tagtgtctg cggAACCGGT gagtacaccg gaattgccag 180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaatccc gctcaatgcc tggagatttg ggcgtgcccc 240
cgcgagactg ctagccgagt agtgtgggt cgcgaaaggc cttgtggcac tgcctgata 300
ggtgcttgcg agtccccgg gaggtctcgt agaccgtgca cc 342

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Hepatitis Type C1b Virus (HCV)

<220>

<223> Nucleotide Sequence of PCR Sense Primer for Amplifying Mutated Fragments of HCV1b cDNA

<400> 8

cccaagcttgcagccccct gatgggggc 29

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Hepatitis Type C1b Virus (HCV)

<220>

<223> Nucleotide Sequence of PCR Anti-sense Primer for Amplifying Mutated Fragments of HCV1b cDNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7 / 7

<400> 9

ggtgcacggt ctacgagacc

20

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Renilla luciferase

<220>

<223> Nucleotide Sequence of PCR Sense Primer for Amplifying Renilla luciferase gene

<400> 10

accgtgcacc atgacttcga aagtttatga

30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Renilla luciferase

<220>

<223> Nucleotide Sequence of PCR Anti-sense Primer for Amplifying Renilla luciferase gene

<400> 11

ttggcgcc ttattgttca tttttgagaa

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03682

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/09, C12N15/67, C12Q1/68, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHEDMinimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12N15/09, C12N15/67, C12Q1/68, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	JP, 10-327871, A (Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 15 December, 1998 (15. 12. 98) (Family: none)	1-6, 8-10, 19, 20, 22, 23, 28-32
P, X	GAINS, P. et al., "pIRES-CD4t, a dicistronic expression vector for MACS-or FACS-based selection of transfected cells", Biotechniques (April, 1999) Vol. 26, No. 4 p.683-688	1-10, 19, 20, 22, 23, 28-32
X	DIRKS, W. et al., "Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells", Gene (1993) Vol. 128, No. 2 p.247-249	1-10, 19, 20, 22, 23, 28-32
Y		11-18, 35, 36
Y	BROWN, E.A. et al., "Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs", Nucleic Acids Research (1992) Vol. 20, No. 19 p.5041-5045	11-18, 35, 36

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	earlier document but published on or after the international filing date
"E" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
6 October, 1999 (06. 10. 99)Date of mailing of the international search report
19 October, 1999 (19. 10. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03682

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FUKUSHI, S. et al., "The sequence element of the internal ribosome entry site and a 25-Kilodalton cellular protein contribute to efficient internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA", Journal of Virology (1997) Vol. 71, No. 2 p.1662-1666	11-18, 35, 36
Y	REYNOLDS, J.E. et al., "Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation", The EMBO Journal (1995) Vol. 14, No. 23 p.6010-6020	11-18, 35, 36
Y	TSUKIYAMA-KOHARA, K et al., "Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA", Journal of Virology (1992) Vol. 66, No. 3 p.1476-1483	11-18, 35, 36
Y	JP, 7-69899, A (Mitsubishi Chemical Corp.), 14 March, 1995 (14. 03. 95) (Family: none)	11-18, 35, 36
A	BUKH, J. et al., "Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) Vol. 89, No. 11 p.4942-4946	21, 24-27, 33, 34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03682

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 37

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 37 pertains to diagnostic methods practiced on the human body and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

THIS PAGE IS ANK DOCTOR

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/03682

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl° C12N 15/09, C12N 15/67, C12Q 1/68, A61K 48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl° C12N 15/09, C12N 15/67, C12Q 1/68, A61K 48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	JP, 10-327871, A (財団法人化学及血清療法研究所) 15.12月. 1998 (15.12.98) パテントファミリーなし	1-6, 8-10, 19, 20, 22, 23, 28-32
P, X	GAINS, P. et al. "pIRES-CD4t, a dicistronic expression vector for MACS-or FACS-based selection of transfected cells", Biotechniques (April, 1999) 第26巻, 第4号 p. 683-688	1-10, 19, 20, 22, 23, 28-32

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.10.99

国際調査報告の発送日

9.10.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

六笠 紀子

4B 9735

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	DIRKS, W. et al. "Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells", Gene (1993) 第128巻, 第2号 p. 247-249	1-10, 19, 20, 22, 23, 28-32
Y		11-18, 35, 36
Y	BROWN, E. A. et al. "Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs", Nucleic Acids Research (1992) 第20巻, 第19号 p. 5041-5045	11-18, 35, 36
Y	FUKUSHI, S. et al. "The sequence element of the internal ribosome entry site and a 25-Kilodalton cellular protein contribute to efficient internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA", Journal of Virology (1997) 第71巻, 第2号 p. 1662-1666	11-18, 35, 36
Y	REYNOLDS, J. E. et al. "Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation", The EMBO Journal (1995) 第14巻, 第23号 p. 6010-6020	11-18, 35, 36
Y	TSUKIYAMA-KOHARA, K et al. "Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA", Journal of Virology (1992) 第66巻, 第3号 p. 1476-1483	11-18, 35, 36
Y	JP, 7-69899, A (三菱化学株式会社) 14.3月.1995 (14.03.95) パテントファミリーなし	11-18, 35, 36
A	BUKH, J. et al. "Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 第89巻, 第11号 p. 4942-4946	21, 24-27, 33, 34

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 37 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲37は、人の身体の診断方法であるから、
この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をできる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

卷之三十一

PCT

**NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)**

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Date of mailing:
09 March 2000 (09.03.00)

in its capacity as elected Office

International application No.:
PCT/JP99/03682

Applicant's or agent's file reference:
99P137WO

International filing date:
08 July 1999 (08.07.99)

Priority date:
27 August 1998 (27.08.98)

Applicant: YAMADA, Osamu et al

1 The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
30 July 1999 (30.07.99)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20 Switzerland

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

preferable that the region, from which the IRES has been derived, has IRES activity.

When the 5'-untranslated region in the nucleic acid sequence for enhancing expression of useful genes comprises any sequence corresponding to a pyrimidine-rich tract, BoxA, BoxB and/or trans factor-binding site, those having a substitution, 5 deletion, insertion and/or addition mutation(s) of a single or a few nucleotides of a sequence derived from a wild-type virus within the sequence or a proximate sequence(s) (regions other than highly conserved ones) to the sequence in at least one position among the above, are also preferable as the nucleic acid sequence for enhancing expression of a useful gene according to the present invention. When the 10 nucleic acid sequence for enhancing expression of a useful gene comprises a sequence corresponding to a variable region of the 5'-untranslated region, it is preferable that the corresponding sequence contains a mutation sequence i.e., substitution, deletion, insertion and/or addition of a single or a few nucleotides of a sequence derived from a wild-type virus. It is preferable that the mutation(s) can accelerate directly or 15 indirectly IRES activity.

The nucleic acid sequence for enhancing expression of a useful gene containing the above-mentioned 5'-untranslated region or a variant of a fragment thereof is preferably obtained through mutation including substitution, insertion and/or deletion in a region other than the highly conserved region of the 5'-untranslated region of a 20 viral gene. In particular, when the nucleic acid sequence for enhancing expression of a useful gene includes IRES, the pyrimidine-rich tract, in particular, a variant where BoxA and/or BoxB are/is conserved may advantageously be used. A mutation may be introduced into the sequence by using, for example, a mutagenesis technique using PCR.

25 The location where the nucleic acid sequence for enhancing expression of a useful gene is incorporated into a gene expression vector should be the one that permit direct or indirect enhancement of expression of a useful gene by means of incorporating the nucleic acid sequence for enhancing expression of a useful gene into an expression vector which has been constructed such that the useful gene can be 30 expressed, however, it is preferable that the location is downstream of the expression regulatory promoter sequence and upstream of the first useful gene. Additionally, the nucleic acid sequence for enhancing expression of a useful gene should be incorporated

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

**NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SUMIDA, Yoshihiro
 Arco Patent Office
 Bo-eki Building, 3rd floor
 123-1, Higashimachi
 Chuo-ku, Kobe-shi
 Hyogo 650-0031
 JAPON



Date of mailing (day/month/year) 23 November 2000 (23.11.00)	
Applicant's or agent's file reference 99P137WO	
International application No. PCT/JP99/03682	International filing date (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)
Applicant FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD. et al	IMPORTANT NOTIFICATION

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AU,CA,CN,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

JP,KR

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Elliott Peretti Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 99P137WO	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP99/03682	International filing date (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)	Priority date (day/month/year) 27 August 1998 (27.08.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/09, 15/67, C12Q 1/68, A61K 48/00		
Applicant FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 10 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 30 July 1999 (30.07.99)	Date of completion of this report 04 July 2000 (04.07.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/03682

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:

pages 1-12,14-59, as originally filed

pages , filed with the demand

pages 13, filed with the letter of 10 March 2000 (10.03.2000)

 the claims:

pages 2-6,11-18,24-27,29-34,36,37, as originally filed

pages , as amended (together with any statement under Article 19

pages , filed with the demand

pages 1,8-10,19-23,28,35, filed with the letter of 10 March 2000 (10.03.2000)

 the drawings:

pages 1-13, as originally filed

pages , filed with the demand

pages , filed with the letter of

 the sequence listing part of the description:

pages 1-7, as originally filed

pages , filed with the demand

pages , filed with the letter of

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. 7 the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/03682

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	11-18,21,24-27,33-37	YES
	Claims	1-6,8-10,19,20,22,23,28-32	NO
Inventive step (IS)	Claims	21,24-27,33,34,37	YES
	Claims	1-6,8-20,22,23,28-32,35,36	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-6,8-37	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Rene, C. A. et al. "The influence of AUG codons in the hepatitis C virus 5' nontranslated region on translation and mapping of the translation initiation window," Virology, Vol. 226, No. 1, 1996, pages 47-56

Document 2: Reynolds, J. E. et al. "Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation," The EMBO Journal, Vol. 14, No. 23, 1995, pages 6010-6020

Claims 1-6, 8-10, 19, 20, 22, 23, and 28-32

Document 1, which was not cited in the international search report, describes a sequence containing an internal ribosomal entry site (IRES) in the 5' nontranslated region of the hepatitis C virus that is downstream from the expression regulating promoter sequence and a vector incorporating a useful gene sequence that is downstream from that segment.

The nucleic acid sequence described in Claims 1-6, 8-10, 19, 20, 22, 23, and 28-32 is indistinguishable from the vector described in document 1 as an entity.

Claims 11-18, 35 and 36

Document 2 describes a 5'-UTR (IRES) sequence up to base sequence No. 341 in the hepatitis C virus (HCV), and in addition to this sequence, it describes the use of a vector (sequence No. 40 to 372) that contains the 5' terminus of the HCV coding region and the expression of a foreign gene that is attached downstream of that region.

This examination finds that persons skilled in the art can make suitable determinations concerning the IRES sequence of HCV described in documents 1 and 2 while observing the expression activity of the length that is utilized.

In addition, this examination finds that persons skilled can suitably utilize a vector having a gene sequence obtained in this manner for therapy as needed.

Therefore, this examination finds that persons skilled in the art can easily prepare the inventions described in Claims 11-18, 35 and 36 based on the descriptions in documents 1 and 2.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/JP99/03682**VI. Certain documents cited****1. Certain published documents (Rule 70.10)**

Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
JP, 9-152864	15 December 1998 (15.12.1998)	26 May 1997 (26.05.1997)	

[E,X]

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day/month/year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特許協力条約

PCT

E P

US

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 99P137WO	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/03682	国際出願日 (日.月.年) 08.07.99	優先日 (日.月.年) 27.08.98
出願人(氏名又は名称) 扶桑薬品工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 - この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 - この国際出願に含まれる書面による配列表
 - この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 - 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
 - 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 - 出願後に提出した書面による配列表が、出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
 - 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものと承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

出願人が提出したものと承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 37 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
　　請求の範囲 37 は、人の身体の診断方法であるから、
　　この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl[®] C12N 15/09, C12N 15/67, C12Q 1/68, A61K 48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl[®] C12N 15/09, C12N 15/67, C12Q 1/68, A61K 48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GenSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	JP, 10-327871, A (財団法人化学及血清療法研究所) 15.12月. 1998 (15.12.98) パテントファミリーなし	1-6, 8-10, 19, 20, 22, 23, 28-32
P, X	GAINS, P. et al. "pIRES-CD4t, a dicistronic expression vector for MACS-or FACS-based selection of transfected cells", Biotechniques (April, 1999) 第26巻, 第4号 p. 683-688	1-10, 19, 20, 22, 23, 28-32

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.10.99

国際調査報告の発送日

19.10.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

六笠 紀子

印

4B 9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO,

C(続き)	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	DIRKS, W. et al. "Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells", Gene (1993) 第128巻, 第2号 p. 247-249	1-10, 19, 20, 22, 23, 28-32
Y		11-18, 35, 36
Y	BROWN, E. A. et al. "Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs", Nucleic Acids Research (1992) 第20巻, 第19号 p. 5041-5045	11-18, 35, 36
Y	FUKUSHI, S. et al. "The sequence element of the internal ribosome entry site and a 25-Kilodalton cellular protein contribute to efficient internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA", Journal of Virology (1997) 第71巻, 第2号 p. 1662-1666	11-18, 35, 36
Y	REYNOLDS, J. E. et al. "Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation", The EMBO Journal (1995) 第14巻, 第23号 p. 6010-6020	11-18, 35, 36
Y	TSUKIYAMA-KOHARA, K et al. "Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA", Journal of Virology (1992) 第66巻, 第3号 p. 1476-1483	11-18, 35, 36
Y	JP, 7-69899, A (三菱化学株式会社) 14.3月.1995 (14.03.95) パテントファミリーなし	11-18, 35, 36
A	BUKH, J. et al. "Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 第89巻, 第11号 p. 4942-4946	21, 24-27, 33, 34

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特許協力条約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 21 JUL 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 99P137WO	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/03682	国際出願日 (日.月.年) 08.07.99	優先日 (日.月.年) 27.08.98
国際特許分類 (IPC) Int.Cl' C12N 15/09, C12N 15/67, C12Q 1/68, A61K 48/00		
出願人（氏名又は名称） 扶桑薬品工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で 10 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I 国際予備審査報告の基礎
- II 優先権
- III 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV 発明の単一性の欠如
- V PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ある種の引用文献
- VII 国際出願の不備
- VIII 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 30.07.99	国際予備審査報告を作成した日 04.07.00
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 六笠 紀子 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448
	4B 9735

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

出願時の国際出願書類

明細書 第 1-12, 14-59 ページ、
明細書 第 _____ ページ、
明細書 第 13 ページ、
出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
10.03.00 付の書簡と共に提出されたもの

請求の範囲 第 2-6, 11-18, 24-27, 29-34, 36, 37 項、
請求の範囲 第 _____ 項、
請求の範囲 第 _____ 項、
請求の範囲 第 1, 8-10, 19-23, 28, 35 項、
出願時に提出されたもの
PCT19条の規定に基づき補正されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
10.03.00 付の書簡と共に提出されたもの

図面 第 1-13 ページ/~~図~~、
図面 第 _____ ページ/~~図~~、
図面 第 _____ ページ/~~図~~、
出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの

明細書の配列表の部分 第 1-7 ページ、
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、
出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

國際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
 PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

明細書 第 _____ ページ
 請求の範囲 第 7 項
 図面 図面の第 _____ ページ/~~図~~

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかつたものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性（N）

請求の範囲	<u>11-18, 21, 24-27, 33-37</u>	有
請求の範囲	<u>1-6, 8-10, 19, 20, 22, 23, 28-32</u>	無

進歩性（I S）

請求の範囲	<u>21, 24-27, 33, 34, 37</u>	有
請求の範囲	<u>1-6, 8-20, 22, 23, 28-32, 35, 36</u>	無

産業上の利用可能性（I A）

請求の範囲	<u>1-6, 8-37</u>	有
請求の範囲	<u></u>	無

2. 文献及び説明（PCT規則70.7）

引用文献1 : RENE, C. A. et al. "The influence of AUG codons in the hepatitis C virus 5' nontranslated region on translation and mapping of the translation initiation window", Virology (1996) 第226巻, 第1号 p. 47-56

引用文献2 : REYNOLDS, J. E. et al. "Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation", The EMBO Journal (1995) 第14巻, 第23号 p. 6010-6020

請求の範囲： 1 – 6、 8 – 10、 19、 20、 22、 23、 28 – 32

国際調査報告に記載しなかった上記引用文献1には、発現制御プロモーター配列の下流に、HCVの5'非翻訳領域の内部リボゾームエントリー部位（IRES）を含む配列が、その下流に有用遺伝子の配列が組み込まれているベクターが記載されている。

ここで、請求の範囲1乃至6、8乃至10、19、20、22、23、28乃至32に記載された核酸配列は、引用文献1に記載されたベクターと物として区別できない。

請求の範囲： 11 – 18、 35、 36

引用文献2には、C型肝炎ウイルス（HCV）の塩基配列341番目までの5' – UTR（IRES）の配列について記載され、この配列に加えてHCVコード領域の5'末端を含む（40番目から372番目の配列）ベクターを用いるとその下流に接続された外来遺伝子が発現することが記載されている。

ここで、引用文献1や2に記載されたHCVのIRESの配列について、用いる長さについては発現活性を見ながら当業者が適宜決定し得たものと認める。

また、このようにして得られた遺伝子配列をもつベクターを治療用に用いることは当業者が必要に応じて適宜なし得たものと認める。

従って、請求の範囲11乃至18、35及び36に係る発明は引用文献1及び2の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。

THIS PAGE BLANK (USPTO

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日.月.年)	出願日 (日.月.年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日.月.年)
JP, 9-152864 〔E, X〕	15.12.98	26.05.97	

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日.月.年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日.月.年)

THIS PAGE BLANK (USPS)

のが好ましい。

上記5' 非翻訳領域もしくはその断片の変異体を含む有用遺伝子発現増強核酸配列は、ウイルス遺伝子の5' 非翻訳領域の高度保存領域以外の領域において、置換、挿入および／または欠失を含む変異により得られるものが好ましい。特に、有用遺伝子発現増強核酸配列にIRES領域が含まれる場合、ピリミジンリッチ領域、特にBoxA、および／またはBoxBが保存された変異体が好適に利用され得る。変異の導入はPCRを用いた突然変異導入法などによって行なわれる。

前記有用遺伝子発現増強核酸配列が遺伝子発現ベクターに組み込まれる位置は、有用遺伝子が発現され得るように構築された発現ベクター内に、有用遺伝子発現増強核酸配列を組み込むことにより、直接的あるいは間接的に有用遺伝子発現を増強させることができる位置とされ、発現制御プロモーター配列の下流、且つ最初の有用遺伝子の配列の上流であることが好ましい。また、有用遺伝子発現増強核酸配列は、発現ベクターに正方向すなわち、5' から3' 方向へと転写、翻訳が行われるように組み込まれるべきである。

遺伝子発現ベクターに組み込まれる前記有用遺伝子発現増強核酸配列は、好ましくはcDNA配列である。そして、前記遺伝子発現ベクターは、好ましくは真核細胞における発現用のベクターである。

前記ウイルスとしては、RNAウイルス、例えばピコルナウイルス、HCVウイルスが好ましい。

なお、HCVのmRNAの5' 非翻訳領域の場合、BoxAは配列番号：1のヌクレオチド第191～199位に、BoxAの上流に存在するピリミジンリッチ領域は配列番号：1のヌクレオチド第40～46位および第120～130位に、そしてBoxBは配列番号：1のヌクレオチド第213～219位に認められ（図1参照、図中トランス因子結合部位に囲みを付している）、また、可変領域は

THIS PAGE BLANK (USPTO)

請求の範囲

1. (補正後) 有用遺伝子の発現増強のために、遺伝子発現ベクターに組み込まれる有用遺伝子発現増強核酸配列であって、

5 該有用遺伝子発現増強核酸配列はウイルス遺伝子の5' 非翻訳領域もし
くはその断片またはその変異体が有する核酸配列を含み、

遺伝子発現ベクターにおいて発現制御プロモーター配列の下流、且つ
最初の有用遺伝子の配列の上流に組み込まれるものであることを特徴と
する有用遺伝子発現増強核酸配列。

10 2. 前記5' 非翻訳領域が、少なくとも1つのピリミジンリッチ領域を
含む請求の範囲第1項記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

3. 前記5' 非翻訳領域が、BoxA、BoxB、トランス因子結合部位および
これらの組合せよりなる群から選択される領域に該当する配列を含む請
求の範囲第1または2項に記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

15 4. 前記5' 非翻訳領域が、AUGまたはATGの配列をさらに含む請求の範
囲第1乃至3項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

5. 前記5' 非翻訳領域が、ウイルスのmRNAのIRES領域の一部または全
体を含む請求の範囲第1乃至4項のいずれかに記載の有用遺伝子発現增
強核酸配列。

20 6. 前記有用遺伝子発現増強核酸配列が、前記核酸配列に加えてウイ
ルス遺伝子の5' 非翻訳領域に隣接する翻訳領域の一部またはその変異体
をさらに含む請求の範囲第1乃至5項のいずれかに記載の有用遺伝子発
現増強核酸配列。

7. (削除)

25 8. (補正後) 前記核酸配列がcDNA配列である請求の範囲第1乃至6
項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9. (補正後) 前記遺伝子発現ベクターが、真核細胞における発現用ベクターである請求の範囲第1乃至6または8項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

10. (補正後) 前記ウイルスが、RNAウイルスである請求の範囲第1乃至6または8もしくは9項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

11. 前記ウイルスが、ピコルナウイルスである請求の範囲第10項記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

12. 前記ウイルスが、HCVウイルスである請求の範囲第10項記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

13. 前記ウイルスがHCVウイルスであり、前記有用遺伝子発現増強核酸配列が、前記核酸配列に加えてHCVウイルスのコア蛋白質翻訳領域の一部またはその変異体をさらに含む請求の範囲第10項記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

14. 前記核酸配列が、以下のヌクレオチド配列すなわち、

gccagcccccc tcatgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60

tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120

ccccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagttacaccg gaattgccag 180

(配列番号：1、ヌクレオチド第1～180位) からなる請求の範囲第12記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

15. 前記核酸配列が、以下のヌクレオチド配列すなわち、

gacgaccggg tccttttttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtcccccc 60

gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtaact gcctgatagg 120

gtgcttgcga gtccccggg aggtctcgta gaccgtgcac c 161

(配列番号：1、ヌクレオチド第181～341位) からなる請求の範囲第12項記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

THIS PAGE BLANK

16. 前記核酸配列が、以下のヌクレオチド配列すなわち、

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gtgcttcgca gtgcggggaggctcgta gaccgtgcac catgagcaca aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacc gccgcccaca ggacgtcaag ttcccgggcg 420
gtggtcagat cggtggtgga gtttacctgt tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc 480
gcgcgactag gaagacttcc gagcggtcgc aacctcggtgg aaggcgacaa cctatcccc 540
5 aggctcgccg gcccgagggc aggacctggg ctcagcccggtatccttgg cccctctatg 600
gcaacgaggg catggggtgg gcaggatggc tcctgtcgcc ccgcggctcc cggcctagtt 660
ggggcccttc ggaccccggttaggtcgc gtaatttggg taaggtcata gat 713

(配列番号：1) からなる請求の範囲第13項記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

10 19. (補正後) 前記核酸配列において、5' 非翻訳領域に含まれるピリミジンリッチ領域、BoxA、BoxB、および／またはトランス因子結合部位に該当する配列のうち、少なくとも1箇所の配列の内部または近傍に、野生型ウイルス由来の配列の1個または数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入および／または付加された配列を含んでいる請求の範囲第3乃至6または8乃至18項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

15 20. (補正後) 前記核酸配列において、5' 非翻訳領域の以外の領域に該当する配列に、野生型ウイルス由来の配列の1個または数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入および／または付加された配列を含んでいる請求の範囲第1乃至6または8乃至19項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

20 21. (補正後) 有用遺伝子の発現増強のために、遺伝子発現ベクターに組み込まれる有用遺伝子発現増強核酸配列であって、
以下のヌクレオチド配列すなわち、

25 gacgaccggg tccttttttggatcaacccg ctcaatgcct ggagatgggg gcgtcccccc 60
gcgagactgc tagccgagta gtgtgggtc gcgaaaggcc ttgtggtaact gcctgatagg 120

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gtgcttcgca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac c 161
(配列番号：1、ヌクレオチド第181～341位)

5 gccagcccc tcatggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccgg gagtacaccc gaattgccag 180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtcccccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttcgca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac c 341
(配列番号：1、ヌクレオチド第1～341位)

10 gacgaccggg tcctttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtcccccc 60
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 120
gtgcttcgca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcaca aatcctaaac 180
ctcaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacc gccggccaca ggacgtcaag ttcccggcgc 240
gtggtcagat cgttggtgga gtttacctgt tgccgcgcag gggcccccagg ttgggtgtgc 300
15 gcfgcactag gaagacttcc gagcggtcgc aacctcggtt aaggcgacaa cctatcccc 360
aggctcgccg gcccgagggc aggacctggg ctcagccgg gtatccttgg cccctctatg 420
gcaacgaggg catgggtgg gcaggatggc tccttcgccc ccggcgtcc cggcctagtt 480
ggggcccttc ggaccccccgg cgtaggtcgc gtaatttggg taaggtcatc gat 533
(配列番号：1、ヌクレオチド第181～713位)、及び

20 gccagcccc tcatggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccgg gagtacaccc gaattgccag 180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtcccccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
25 gtgcttcgca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcaca aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacc gccggccaca ggacgtcaag ttcccggcgc 420

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gtggtcagat cggtggtgga gtttacctgt tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc 480
gcgcgactag gaagacttcc gagcggtcgc aacctcggtgg aaggcgacaa cctatccccca 540
aggctcgccg gcccgagggc aggacctggg cttagcccg gtatccctgg cccctctatg 600
gcaacgaggg catgggtgg gcaggatggc tcctgtcgcc ccgcggctcc cggcctagtt 660
5 ggggccttc ggaccccggtcgca gtaatttggg taaggtcatc gat 713

(配列番号：1) よりなる群から選択されるヌクレオチド配列において、配列番号：1の第207位に相当する位置にチミジンが挿入された核酸配列もしくはその断片またはその変異体が有する核酸配列を含む有用遺伝子発現増強核酸配列。

10 22. (補正後) 前記有用遺伝子発現増強核酸が、翻訳増強活性を有することにより有用遺伝子の発現を増強する請求の範囲第1乃至6または8乃至21項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

23. (補正後) 前記有用遺伝子発現増強核酸配列が、IRES活性を増強することに

THIS PAGE BLANK (USPTO)

より有用遺伝子の発現を増強する請求の範囲第1乃至6または8乃至22項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列。

24. 以下のヌクレオチド配列すなわち、

5	gccagcccccc tcatgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggcc ccccccccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccgggt gagtacacccg gaattgccag gacgaccggg tcctttcttg gatcaatccc gctcaatgcc tggagatttgc ggcgtgc cgcgagactg ctatccgagt agtgttgggt cgcgaaaggc ctttgttac tgcctgatag ggtgcttgcg agtgccccgg gaggtctcgt agaccgtgca cc	60 120 180 240 300 342
---	--	---------------------------------------

10 (配列番号：7) を含み、IRES依存的にmRNA翻訳を増強することにより有用遺伝子の発現を増強させることを特徴とする有用遺伝子発現増強核酸配列。

25. 以下のヌクレオチド配列すなわち、

15	gccagcccccc tcatgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggcc ccccccccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccgggt gagtacacccg gaattgccag gacgaccggg tcctttcttg gatcaatccc gctcaatgcc tggagatttgc ggcgtgc cgcgagactg ctatccgagt agtgttgggt cgcgaaaggc ctttgttac tgcctgatag ggtgcttgcg agtgccccgg gaggtctcgt agaccgtgca cc	60 120 180 240 300 342
----	--	---------------------------------------

20 (配列番号：7) で示される核酸配列が有するIRES活性と同等のIRES活性を有し、該配列の断片または変異体からなるポリヌクレオチドを含み、且つIRES依存的にmRNA翻訳を増強することにより有用遺伝子の発現を増強させることを特徴とする有用遺伝子発現増強核酸配列。

26. 以下のヌクレオチド配列すなわち、

25	gccagcccccc tcatgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggcc	60 120
----	---	-----------

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ccccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccgggt gagtacaccg gaattgccag 180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaatccc gctcaatgcc tggagatttg ggcgtgcccc 240
cgcgagactg ctagccgagt agtgttgggt cgcgaaaggc cttgtggtac tgcctgatag 300
ggtgcttgcg agtgcccccgg gaggtctcgt agaccgtgca cc 342

5 (配列番号：7) からなる単離されたポリヌクレオチド。

27. 以下のヌクレオチド配列すなわち、

gccagccccc tcatggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggcc 120
ccccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccgggt gagtacaccg gaattgccag 180
10 gacgaccggg tcctttcttg gatcaatccc gctcaatgcc tggagatttg ggcgtgcccc 240
cgcgagactg ctagccgagt agtgttgggt cgcgaaaggc cttgtggtac tgcctgatag 300
ggtgcttgcg agtgcccccgg gaggtctcgt agaccgtgca cc 342

(配列番号：7) で示される核酸配列が有するIRES活性と同等のIRES活性を有し、該配列の断片または変異体からなる単離されたポリヌクレオチド。

15 28. (補正後) 請求の範囲第1乃至6または8乃至25項のいずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列を含む遺伝子発現用ベクター。

29. 請求の範囲第28項記載のベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。

20 30. 請求の範囲第28項記載のベクターを用いて有用遺伝子産物を発現させる方法。

31. 請求の範囲第29項記載の宿主細胞を培地中で生育させ、該細胞および／または生育培地から有用遺伝子産物を単離する工程を含む、有用遺伝子産物の製造方法。

25 32. 請求の範囲第28項記載のベクターを用いて、有用遺伝子の発現を増強する方法。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 3 . 請求の範囲第 2 6 または 2 7 項に記載のポリヌクレオチドを含む
、IRESとの相互作用性を有する物質をスクリーニングするためのプロー
ブ。

3 4 . 請求の範囲第 2 6 または 2 7 項に記載のポリヌクレオチドを含む
5 IRES依存性の翻訳開始因子をスクリーニングするためのプローブ。

3 5 . (補正後) 生体内でのキャップ依存的mRNA翻訳の低下に起因する
疾患を治療するために、請求の範囲第 1 乃至 6 または 8 乃至 2 5 項のい
ずれかに記載の有用遺伝子発現増強核酸配列を生体内に導入することに
よってmRNA翻訳を促進することができるよう、該有用遺伝子発現増強核
酸配列を含むこと特徴とする治療用組成物。
10

3 6 . 生体内でのIRES活性の低下に起因する疾患を治療するために、請
求の範囲第 2 4 または 2 5 項に記載の有用遺伝子発現増強核酸配列を生
体内に導入することによってmRNA翻訳を促進することができるよう、該
有用遺伝子発現増強核酸配列を含むこと特徴とする治療用組成物。
15

3 7 . C型肝炎の重症度診断方法であつて、請求の範囲第 2 6 または 2
7 項に記載のポリヌクレオチドを標的として、被験者由来の生体試料中
に含まれる該ポリヌクレオチド配列の存在を検出し、この配列の存在に
基づいてC型肝炎の重症度を診断することを特徴とする方法。

THIS PAGE BLANK (USPTO)